

**HPLC-gestützte Analyse, Optimierung der
mikrobiellen Produktion und enzymatische
Modifizierung von Glycolipiden aus
*Tsukamurella spec. nov.***

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von: Olaf Langer
aus: Wolfenbüttel

1. Referent:	apl. Prof. Dr. S. Lang
2. Referent:	Prof. Dr. K. D. Vorlop
eingereicht am:	29.01.2004
mündliche Prüfung am:	23.07.2004

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Herrn apl. Prof. Dr. S. Lang, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

- O. Langer, E. Vollbrecht, U. Rau und S. Lang (1999) Produktion und biologische Eigenschaften von mikrobiellen Oligosaccharidlipiden. In: Biokonversion nachwachsender Rohstoffe, Schriftenreihe "Nachwachsende Rohstoffe" **15**, Tagungsband, Ed. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. Gülzow, ISBN 3-7843-3044-4, Landwirtschaftsverlag GmbH Münster, pp 271-276
- S. Hammen, R. Heckmann, O. Langer, V. Wray, S. Lang und U. Rau (1999) Veredelung pflanzlicher Öle durch enzymatische Modifizierung biotechnisch gewonnener Tenside. In: Biokonversion nachwachsender Rohstoffe, Schriftenreihe "Nachwachsende Rohstoffe" **15**, Tagungsband, Ed. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. Gülzow, ISBN 3-7843-3044-4, Landwirtschaftsverlag GmbH Münster, pp 99-107
- O. Langer, E. Vollbrecht and S. Lang (2000) Production and biological properties of microbial oligosaccharide lipids. In: Proceedings of the 4th International Congress on Biochemical Engineering, Ed. Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology, Stuttgart, ISBN 3-8167-5570-4, Fraunhofer IRB Verlag Stuttgart, pp 89-93
- O. Langer, V. Lurtz, W. Ramm und S. Lang (2001) Bakterielle Produktion und chemo-enzymatische Modifikation von Glycolipiden. In: 19. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Tagungsband, Ed. DECHEMA Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V. Frankfurt am Main, Druckhaus K. Schmitt Wwe. Frankfurt am Main, pp 221-223
- O. Langer, V. Lurtz and S. Lang (2001) Biosurfactants from Domestic Vegetable Oils and Their Chemo-Enzymatic Modification. Lipids, Fats and Oils: Reality and Public Perception. 24th World Congress and Exhibition of the International Society for Fat Research (ISF), ISBN 1-893997-16-X, AOCS Press, p. 11

Tagungsbeiträge:

- O. Langer, E. Vollbrecht, U. Rau und S. Lang (1999) Produktion und biologische Eigenschaften von mikrobiellen Oligosaccharidlipiden. 2. Workshop "Biokonversion nachwachsender Rohstoffe", FAL Braunschweig, 14./15. Oktober 1999.
- O. Langer, E. Vollbrecht and S. Lang (2000) Production and biological properties of microbial oligosaccharide lipids. Proceedings of the 4th International Congress on Biochemical Engineering, Fraunhofer Institut Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, 17./18. Februar 2000.
- S. Lang, S. Hammen, R. Heckmann, O. Langer, E. Vollbrecht and U. Rau (2000) Glycolipids: Studies on Their Microbial Production, Chemoenzymatic Modification and Properties. Minisymposium on New Syntheses with Oils and Fats as Renewable Raw Materials for the Chemical Industry, Universität Oldenburg, 14. Juni 2000
- O. Langer, V. Lurtz, W. Ramm und S. Lang (2001) Bakterielle Produktion und chemo-enzymatische Modifikation von Glycolipiden. 19. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Universität Leipzig, 13.-15- März 2001.
- O. Langer, V. Lurtz and S. Lang (2001) Biosurfactants from Domestic Vegetable Oils and Their Chemo-Enzymatic Modification. Lipids, Fats and Oils: Reality and Public Perception. 24th World Congress and Exhibition of the International Society for Fat Research (ISF), ICC Berlin, 16.-20. September 2001.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig angefertigt. Die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (Gülzow) und das Ministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Forsten förderten diese Arbeit innerhalb eines Projektverbundes.

Ich möchte besonders Herrn apl. Prof. Dr. S. Lang für die Überlassung des Themas, die Förderung und wissenschaftliche Betreuung der Arbeit sowie für die Übernahme des Referats danken.

Herrn Prof. Dr. Vorlop danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates sowie Herrn Prof. Dr. Jahn für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission.

Besonderer Dank gilt meinem Kollegen und Freund Herrn Dr. Rolf Heckmann. Die vielfältigen Diskussionen und die hervorragende Kollegialität haben die Arbeitsatmosphäre angenehm gestaltet und damit die Motivation stets unterstützt.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Abt. Biotechnologie möchte ich meinen Dank für das immer angenehme Arbeitsklima und die kreative Zusammenarbeit aussprechen. Insbesondere: Herrn PD. Dr. Udo Rau, Wolfgang Graßl, Detlev Rasch, Stefan Weferling, Andrea Walzog, Ute Weser, Werner Ramm, Sabine Hammen, Anke Dieringer, Elke Vollbrecht, Olof Palme und Verena Lurtz.

Mein besonderer Dank gilt Frau M. Hesse und ihrem Mann, die mich durch ihre stete Hilfsbereitschaft und offene Diskussionsbereitschaft sehr unterstützt haben.

Herrn Dr. V. Wray danke ich herzlich für die Aufnahme der komplexen NMR-Spektren und für seine Hilfe bei der Interpretation des umfangreichen Spektrenmaterials. Herrn Dr. M. Nimtz danke ich für die Aufnahme der MS und MS/MS Massenspektren und für die Unterstützung bei deren Auswertung.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Christian, danke ich ganz herzlich für die Unterstützung während der Zeit meiner Ausbildung, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG.....	1
2	MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1	Mikroorganismus.....	11
2.2	Chemikalien	12
2.3	Kulturführung	13
2.3.1	Stammhaltung	13
2.3.2	Nährmedien	13
2.3.3	Sterilisation der Nährmedien und Substrate	15
2.3.4	Vorkulturen	16
2.3.5	Hauptkultur	16
2.3.6	Bioreaktorkultivierungen	16
2.3.7	Immobilisierung der Biomasse	18
2.4	Kultivierungsparameter	18
2.4.1	Bestimmung der Biotrockenmasse	18
2.4.2	Bestimmung der Lipaseaktivität.....	18
2.4.3	Bestimmung der Ammoniumkonzentration.....	19
2.4.4	Bestimmung der Phosphatkonzentration.....	20
2.4.5	Proteinbestimmung.....	20
2.4.6	Proteinbestimmung trägerfixierter Biomasse.....	21
2.4.7	Bestimmung des Substrates (Triglyceride und Fettsäuren) über HPLC ...	22
2.4.8	Bestimmung der Glycolipide	23
2.4.9	Abgasanalyse	24
2.4.10	Ausbeutekoeffizienten	26
2.5	Aufarbeitung.....	27
2.5.1	Probenaufarbeitung	27
2.5.2	Präparative Schichtchromatographie.....	28
2.5.3	Flash-Säulenchromatographie	28
2.5.4	MPLC	29
2.6	Chemische und biochemische Methoden zur Modifikation der Glycolipide.....	29
2.6.1	Alkalische Verseifung der Glycolipide.....	29
2.6.2	Enzymatische Umsetzungen	30
2.7	Physikalische Methoden	31
2.7.1	Oberflächenspannung	31

2.7.2 Emulsionstest und HLB-Wert	32
2.8 Biologische Methoden.....	34
2.8.1 Agardiffusionstest.....	34
2.8.2 Röhrchentest zur Bestimmung des IC ₅₀ - und MHK-Wertes.....	35
2.8.3 Externe biologische Aktivitätstests	36
2.9 Analytische Methoden.....	37
2.9.1 Dünnschichtchromatographie.....	37
2.9.2 Strukturaufklärung	38
3 ERGEBNISSE.....	39
3.1 Produktzusammensetzung und Strukturaufklärung	39
3.2 HPLC-gestützte Substrat- und Produktbestimmung	42
3.2.1 HPLC-Analytik	44
3.3 Optimierung der mikrobiellen Glycolipidproduktion	48
3.3.1 Puffersystem	48
3.3.2 Kultivierung mit Zellen aus der stationären Phase	49
3.3.3 Limitierungsversuche.....	53
3.3.4 Hemmende Einflüsse auf Wachstum und Produktbildung.....	64
3.3.5 Einfluss der Biomassekonzentration auf die Produktion.....	72
3.3.6 Einfluss anderer Pflanzenöle auf die Produktzusammensetzung und -konzentration.....	78
3.4 Aufarbeitung der Rohprodukte	83
3.4.1 Down-stream processing nach der Kultivierung	83
3.4.2 Down-stream processing während der Kultivierung	85
3.5 Modifikation der nativen Oligosaccharidlipide von <i>Tsukamurella spec.</i>	87
3.5.1 Darstellung der Zuckergrundgerüste G1, G2, und G3 durch alkalische Verseifung	87
3.5.2 Enzymatische Hydrolyse der nativen Glycolipide	88
3.5.3 Enzymatische Acylierung der nativen Oligosaccharidlipide.....	94
3.5.4 Enzymatische Acylierung der Zuckergrundgerüste	107
3.5.5 Spaltung von GL 3 mittels Galactosidasen.....	116
3.6 Physikochemische Eigenschaften.....	119
3.6.1 Löslichkeit der Glycolipide in Wasser	119
3.6.2 Einfluß auf die Oberflächenspannung von Wasser; kritische Micellbildungskonzentration (cmc)	120

3.6.3	Emulsionsstabilität und HLB-Wert	122
3.7	Biologische Aktivität	126
3.7.1	Antimikrobielle Eigenschaften	126
3.7.2	Pharmakologische Assays	129
4	DISKUSSION	132
4.1	Analyseverfahren	134
4.2	Mikrobielle Produktion	137
4.3	Modifikation der nativen Glycolipide	146
4.4	Physikochemische Eigenschaften	151
4.5	Biologische Eigenschaften	153
5	ZUSAMMENFASSUNG	156
6	ANHANG	158
6.1	Tabellen mit spektroskopischen Daten	158
6.2	Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	170
7	LITERATUR	172

1 EINLEITUNG

Biotenside

Naturstoffe, ob aus Pflanzen oder Mikroorganismen, stellen sowohl eine ressourcenschonende und umweltverträgliche Alternative für chemisch synthetisierte Produkte dar und bieten darüber hinaus in der Wirkstoffforschung einen der Ausgangspunkte bei der Suche nach neuen Leitstrukturen, die zu neuen Arzneimitteln, Pflanzenschutzmitteln oder Nahrungsergänzungsstoffen führen können. Die Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen bei der Produktion dieser Naturstoffe verfolgt dabei das Ziel, einen geschlossenen Stoffkreislauf zu realisieren und die wertvollen fossilen Rohstoffquellen zu schonen.

Unter dem Begriff nachwachsender Rohstoffe werden land- und forstwirtschaftlich erzeugte Produkte zusammengefasst, die nicht zur Ernährung oder als Futtermittel genutzt werden. Das sind sowohl tierische als auch pflanzliche Stoffe, wie beispielsweise Zucker, Stärke, Zellulose, Naturkautschuk, Öle und Fette, ätherische Öle sowie Proteine.

Umweltprobleme, die aus der Nutzung fossiler Rohstoffe entstehen, aber auch die Suche nach Zukunftsperspektiven für die Agrarindustrie, haben das Interesse an der belebten Natur als Rohstoffquelle wieder belebt. Für die Landwirte existiert die Möglichkeit, nachwachsende Rohstoffe auf landwirtschaftlichen Stilllegungsflächen anzubauen, ohne vereinbarte Stilllegungsprämien zu verlieren. Damit können insbesondere Pflanzenöle deutlich unter Weltmarktpreisen angeboten werden. Auch durch Projektträgerschaften (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, Gülzow) und z.B. den Modellversuch „Wärme- und Stromgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen“ wird der landwirtschaftliche Anbau von pflanzlichen Rohstoffen von der Bundesregierung gefördert. Weiterhin ist in Deutschland Biokraftstoff vollständig von der Mineralölsteuer befreit [HAUTHAL, 1996]. Das Bestreben, potentielle Anwendungen für Pflanzeninhaltsstoffe zu finden, steht zur Zeit in großem öffentlichen Interesse. Biologische Abbaubarkeit und kontinuierliche Erneuerung der verwendeten Rohstoffe sind ein wünschenswertes Anliegen. Beim Vergleich der

Produktion von nachwachsenden Rohstoffen mit dem Verbrauch von fossilen Rohstoffen muss klar werden, dass ein vollständiges Verdrängen der fossilen Rohstoffe nicht möglich ist. Dazu ist die Differenz zwischen Bedarf und Angebot zu eklatant. Ein sinnvolles Einsatzgebiet für nachwachsende Rohstoffe ist deren Veredelung und ihre Nutzung in der chemischen Industrie.

Neben dem erfolgreichen Einsatz biotechnologischer Verfahren beim Abbau von Abfall- und Reststoffen in Kläranlagen, Kompostierungs- und Biogasanlagen, gewinnen sie, wie anfangs erwähnt, auch bei der Herstellung von Wirkstoffen immer mehr an Bedeutung. Dabei steht die Biokonversion nachwachsender Rohstoffe jedoch noch am Anfang ihrer Möglichkeiten, und es gibt noch nicht viele etablierte Verfahren. Der direkte Vergleich zu klassisch chemischen Produkten (Polymere, Tenside) zeigt, dass diese mengenmäßig überwiegen [WARWEL, 1998].

Die Tenside sind in diesem Zusammenhang eine wichtige Produktklasse. Sie werden weltweit mit einer Jahresproduktion von einigen Millionen Tonnen vorwiegend klassisch chemisch hergestellt [HILL, 1998; HAUTHAL, 1996; RICHTLER ET AL., 1991; WIRTH, 1975]. Heute werden ungefähr 90 % aller bekannten Tenside dabei aus den fünf Bausteinen Fettsäuren, Fettsäuremethylester, Fettalkohole, Fettalkoholpolyglycolether und Alkylaromaten synthetisiert, die sowohl aus natürlichen und aus petrochemischen Rohstoffen stammen [FABRY, 1991].

Verbindungen, die einen hydrophilen (polaren) und einen hydrophoben (unpolaren) Teil enthalten, werden allgemein als Tenside bezeichnet. Infolge dieses amphiphilen Charakters sind sie in verschiedenartigen Lösungsmitteln, insbesondere in Wasser, grenzflächenaktiv. Das heißt, sie reichern sich in den Grenzflächen der wässrigen Phase an, und zwar unabhängig davon, ob eine gasförmige, flüssige oder feste Phase angrenzt. Bei dieser Adsorption bilden die Tensidmoleküle monomolekulare Filme an den Grenzflächen aus, die die Eigenschaften der Systeme nachhaltig beeinflussen können. Die Grenzflächenadsorption führt aus thermodynamischen Gründen zur Reduktion der Grenzflächenspannung zwischen Wasser und der angrenzenden Phase, zur Veränderung der Benetzungseigenschaften zwischen Wasser und Feststoffen und zur Ausbildung elektrischer Doppelschichten an den Grenzflächen. Außerdem bilden die Tensidmoleküle in der Lösung beim

Überschreiten einer charakteristischen Konzentration durch reversible Aggregation größere Molekülverbände (Kugeln, Stäbchen, Scheibchen, Lamellen, Versikel), die Mizellen genannt werden; zwischen Monomeren und Mizellen besteht ein thermodynamisches Gleichgewicht. Bei Mizellen in Wasser als Lösungsmittel sind die hydrophoben Gruppen im Inneren möglichst ohne direkten Kontakt mit der umgebenden Wasserphase, bei jenen in Kohlenwasserstoffen zeigen die hydrophilen Gruppen nach innen (inverse Mizellen). Die Aggregation der Tensidmoleküle zu Mizellen setzt beim Überschreiten einer bestimmten, für das jeweilige Tensid charakteristischen Konzentration ein. Die Aggregation ist reversibel, d. h., beim Verdünnen der Lösung unter diese charakteristische Konzentration, auch kritische Mizellbildungskonzentration (cmc) genannt, zerfallen die Mizellen wieder in monomere Tensidmoleküle. Der Zahlenwert der cmc hängt für jedes Tensid von seiner Konstitution sowie von verschiedenen äußeren Parametern ab.

Die Geschichte der Tenside ist eng mit der Kulturgeschichte des Menschen verbunden. Schon sumerische Keilschriften aus der Zeit 2500 v. Chr. beschreiben die Herstellung einer seifenähnlichen Masse durch Verkochen von Olivenöl mit Holzasche [FABRY, 1990]. Ende des 18. Jahrhunderts wurden Baumwollstoffe zur Massenware, deren Behandlung entsprechende Mengen an preiswerten Seifen erforderte. Dieses Problem konnte erst durch Nicolas Leblanc zufrieden stellend gelöst werden. Er entwickelte ein Verfahren, mit dem Soda aus Kochsalz, Schwefelsäure, Kalk und Kohle gewonnen werden konnte. Mit Beginn des 20. Jahrhunderts und dem Übergang von der Hand zur Maschinenwäsche war die Entwicklung leistungsfähiger, so genannter selbständiger Tenside verbunden. Es handelte sich dabei um Seifen, die kombiniert mit Soda, Wasserglas und Perborat auf den Markt kamen. Die Suche nach anderen, synthetischen, Tensiden mit besseren Eigenschaften führte zu der Entwicklung der ersten Alkylbenzolsulfonate. Das Tetrapropylbenzolsulfonat (TPS) deckte bis in die sechziger Jahre etwa 65 % des gesamten westlichen Tensidbedarfs. Bedingt durch den hohen Verzweigungsgrad des Alkylrestes ergab sich eine unzureichende biologische Abbaubarkeit, die im Sommer 1959 durch riesige Schaumberge auf Flussläufen und Staustufen erstmals das Interesse der Öffentlichkeit erregte. Gute biologische Abbaubarkeit zeigten erst die linearen Alkylbenzolsulfonate (LAS), die ab 1964 die TPS ersetzten und auch noch heute die klassischen Waschmitteltenside darstellen [SCHÖBERL, 1988].

Die bisher bekannten chemisch hergestellten Tenside werden nach Hoffman & Ulbricht [1993] folgendermaßen klassifiziert:

a) nach hydrophilen Gruppen

- Anionische Tenside (Carboxylate, Sulfonate und Sulfate)
- Kationische Tenside
- Zwitterionische Tenside
- Nichtionische Tenside, u.a. Zuckertenside
- Tenside mit mehreren hydrophilen Gruppen

a) nach hydrophoben Gruppen

- Kohlenwasserstofftenside
- Perfluortenside
- Silicontenside
- Block-Copolymere

Der mengenmäßig größte Anteil wird in Wasch- und Reinigungsmitteln in Haushalt, Gewerbe und Industrie eingesetzt [KOSSWIG, 1982]. Bereits 1995 lag der Verbrauch an Wasch- und Reinigungsmitteln bei 43 Millionen Tonnen pro Jahr. Die Ethoxylat- und Sulfonat/Sulfat-Tenside machen mit einer Produktion von 6.5 Mio. t 80% des Weltmarktes an synthetischen Tensiden aus. Weitere Anwendungsbereiche sind die Lebensmittelindustrie, Landwirtschaft (Schädlingsbekämpfung, Bodenverbesserung, Bodensanierung), Pharmazie (Solubilisierung von Wirkstoffen, Desinfektionsmittel), Kosmetik und die chemische Industrie (Textil- und Lederverarbeitung, Farben, Lacke, Klebstoffe, Papier u.a.) [GEKE et al. 1993; ADAM et al., 1993].

Als Alternative zu diesen aus petrochemischen Rohstoffen gewonnenen Tensiden bieten sich grenzflächenaktive Substanzen auf der Basis der nachwachsenden Rohstoffe an. Da fast alle Tenside nach ihrem Gebrauch als Abfallstoffe in Abwässern zurückbleiben, ist ein besonderes Interesse an deren biologischer Verträglichkeit und biologischer Abbaubarkeit gegeben. Die Herstellung von Alkylpolyglycosiden (APG) aus nachwachsenden Rohstoffen [ESKUCHEN und NITSCHKE, 1996] ist ein Schritt in diese Richtung. Aus Pflanzenölen (Kokosfett, Palmkernöl, Talg, Palm- oder Rapsöl) und Stärke (Mais-, Weizen- oder Kartoffelstärke) werden diese nichtionischen Tenside gewonnen. Wasch- und Reinigungsmittel bestehen zu 5-10 % aus nichtionischen Tensiden [UPADEK und

KINGS, 1991] und deren biologische Abbaubarkeit kann problematisch sein. Die Konzentration nichtionischer Tenside in Abwässern wird mit einem Maximalwert von 10 mg l^{-1} angegeben [STEBER et al., 1996]. APG's werden in Kläranlagen zu 99 % abgebaut, womit in aufbereiteten Abwässern eine Endkonzentration von maximal 100 µg l^{-1} erreicht wird.

Für den Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen zur Tensidproduktion bieten sich zwei verschiedene Strategien an:

- Fette und Öle werden durch die Basis-Verfahren der Fettchemie in Basisstoffe umgewandelt [EIERDANZ, 1993]. Neue Entwicklungen im Tensidbereich ergaben sich nicht nur durch chemische Reaktionen an der Säurefunktion zu den anionischen Tensidgruppen der Fettalkoholsulfate (FAS) oder durch Einführung einer Sulfonatgruppe, in α -Stellung, zu den α -Sulfofettsäuren (α -Disalze) bzw. α -Sulfo-Fettsäuremethylestern (α -Estersulfonate), sondern auch durch Glucosidierung der Fettalkohole zu den schon erwähnten neutralen Alkylpolyglycosiden (APG). Da es sich bei diesen Verfahren um rein chemische Synthesen mit lediglich landwirtschaftlich produzierten Basischemikalien handelt, kann die Synthesereaktion kostengünstig in herkömmlichen Reaktoren mit großen Ausbeuten durchgeführt werden.
- Fette und Öle werden durch die Syntheseleistung von Mikroorganismen in neue Produkte umgewandelt. Bei diesem Verfahren wird die Fähigkeit bestimmter Mikroorganismen ausgenutzt bei der Kultivierung auf Fetten, Ölen sowie Alkanen, Kohlenhydraten und industriellen Abfallprodukten, wie sie zum Beispiel bei der Olivenölherstellung anfallen, Biotenside herzustellen [SYLDATK et al., 1984; 1985; 1987]. Derartige rein biotechnologische Verfahren werden bisher erst selten in kommerzielle Produkte umgesetzt. Die Gründe hierfür sind in erster Linie in den momentan noch hohen Produktionskosten zu sehen.

Seit den ersten Veröffentlichungen über oberflächenaktive Substanzen aus Mikroorganismen von 1946 [ZOBELL, 1946] wurde eine Vielzahl an Biotensiden beschrieben [SYLDATK et al., 1984; LIN, 1996; DESAI und BANAT, 1997; LANG, 2002]. Biotenside sind eine strukturell sehr heterogene Gruppe von oberflächenaktiven

Verbindungen, die sowohl von Prokaryonten als auch von Eukaryonten synthetisiert werden. Abhängig von ihrem molekularen Aufbau lassen sich im wesentlichen fünf verschiedene Strukturklassen unterscheiden:

- Glycolipide
- Lipoaminosäuren und Lipopeptide
- Polymere Tenside (Lipoproteine, Lipopolysaccharide, u.a.)
- Phospholipide
- Mono- und Diglyceride, Fettsäuren

Die größte Stoffklasse, die auch das größte biotechnologische Potential besitzt und zu denen auch die in dieser Arbeit gewonnenen Lipide gehören, sind die Glycolipide. Sie bestehen aus einer hydrophilen Mono-, Di oder Oligosaccharideinheit, an die an einer oder mehreren Positionen esterförmig oder glycosidisch Kohlenwasserstoffketten gebunden sind. Die bekannten mikrobiellen Glycolipide weisen ähnliche Eigenschaften wie die Alkylpolyglycoside auf und haben demnach die gleichen Potentiale wie die chemisch hergestellten. Die Frage ist nur, inwieweit ein biotechnologisches Verfahren zur Glycolipidgewinnung mit dem etablierten chemischen Verfahren zur APG-Gewinnung kostenmäßig konkurrieren kann. Erfolgversprechend ist hierbei die Herstellung von Sophoroselipiden mit der Hefe *Candida bombicola* zu nennen. Für sie wurden kontinuierliche Verfahren zur Tensidgewinnung vorgestellt [FIEHLER et al., 1997; KIM, 1997; RAU et al., 1996; RAU et al., 2001], die ohne weiteres mit chemischen Prozessen konkurrieren können.

Über die Funktion der Biotenside für den Mikroorganismus ist viel spekuliert worden. Viele Lebensprozesse sind ohne Beteiligung von Amphiphilen nicht denkbar. Sie stellen die Grundbausteine in biologischen Membranen und Zellwänden dar, sie gewährleisten den Stofftransport, den Stoffaustausch und den Stoffwechsel lebender Organismen. Glycolipide sind auf der Oberfläche jeder Säugerzelle anzutreffen. Gemäß ihres hydrophoben Teils werden sie in zwei Klassen eingeteilt, in die Glycosphingolipide und Glycoglycerolipide [LOCKSTOFF, 1991]. In Säugerzellen dienen sie aufgrund ihrer exponierten Stellung in der Zellmembran als Bindungsstellen von Lectinen, Antikörpern, Toxinen, Bakterien oder Viren und übernehmen damit wichtige Funktionen bei der Kommunikation der Zelle mit ihrer äußeren Umgebung. Bei Mikroorganismen liegt die Vermutung nahe, da die meisten dieser Organismen in der Lage sind, schlecht wasserlösliche Kohlenwasserstoffe zu metabolisieren, dass die Tenside den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, die

Aufnahme des lipophilen Substrates, erleichtern. Dies kann durch den Einbau der Tenside in die Membran und einer dadurch bedingten Hydrophobisierung oder durch Sekretion in das umgebende Medium und einer dadurch bedingten Emulgierung der Kohlenwasserstoffe erfolgen. Zusätzlich sind Biotenside in der Zell-Festhaltung an Oberflächen involviert, was z.B. größere Stabilität unter feindlichen Umgebungsbedingungen verleiht. Auch sind sie an der Zell-Desorption beteiligt, um neue Habitate zum Überleben zu finden und üben antagonistische Effekte gegenüber anderen Mikroorganismen in der Umgebung aus (NEU, 1996; DESAI and BANAT, 1997).

In Tabelle 1.1 sind einige bekannte Glycolipide aufgeführt. Als Rohstoffe können, je nach Organismus, Kohlenhydrate, Pflanzenöle (bzw. deren Derivate) oder Alkane eingesetzt werden. Einige Organismen können auch alle genannten Substrate für die Glycolipidbildung nutzen.

Tabelle 1.1: Mikrobiell produzierte Glycolipide

Glycolipid	Organismus	Literatur
Glucoselipide	<i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Alcanivorax borkumensis</i>	[EL-SHARKAWY, 1996] [PASSERI et al., 1992]
Cellobioselipide	<i>Ustilago zeae</i> PRL 119	[LEMIEUX, 1951] [BOOTHROYD et al., 1965]
Mannosylerythritollipide	<i>Ustilago spec.</i> PRL 627 <i>Candida spec.</i> <i>Candida antartica</i> <i>Ustilago maydis</i>	[BOOTHROYD et al., 1956] [KAWASHIMA et al., 1983] [KITAMOTO et al., 1990] [SPÖCKNER, 1998]
Rhamnoselipide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[ITO et al., 1971] [SYLDATK et al. 1983]
Sophoroselipide	<i>Candida bombicola</i>	[ASMER et al, 1988] [DAVILA et al., 1992] [RAU et al., 1996]
Trehaloselipide	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter spec.</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Corynebacterium spec.</i>	[KIM et al., 1990] [RISTAU & WAGNER, 1983] [RAPP et al., 1979] [KRETSCHMER et al., 1982] [PASSERI et al., 1991] [BERSA et al., 1992] [WALLACE & MINNIKIN, 1996] [SCHMEICHEL et al., 1989]
Lipooligosaccharide	<i>Mycobacterium spec.</i> <i>Nocardia corynebacteroides</i> <i>Tsukamurella spec.</i>	[KAMISANGO et al, 1985] [HARTMANN et al., 1994] [POWALLA, 1990] [VOLLBRECHT et al., 1998]

Es zeigt sich, dass mikrobielle Glycolipide eine große Palette an Anwendungspotentialen besitzen, die für chemisch hergestellte Alkylpolyglycoside nicht möglich sind, da diese zum einen auf gewöhnliche Kohlenhydrat- und Fettsäurebausteine beschränkt sind und zum anderen aus einem Gemisch von Glycolipiden bestehen, bei denen der Lipidanteil nur wenig regiospezifisch an den Kohlenhydratbausteinen gebunden ist. In direkter Konkurrenz zu den mikrobiellen Glycolipiden stehen sie allerdings als Bulk-Produkte im Wasch- und Reinigungsmittelsektor.

Eine mögliche Anwendung von mikrobiellen Biotensiden im Vergleich zu chemisch synthetisierten ist im Kosmetikbereich zu finden [TESMANN et al., 1996; MATTHIES et al., 1996]. So werden zum Beispiel Sophoroselipide und Saccharose-laurate mit verschiedenen Acylierungsgraden in Körperpflegemitteln als Feuchtigkeitsspender genutzt [BROWN, 1991; INOUE, 1988; RYBINSKY und HILL, 1998]. Insbesondere bei nichttoxischen Produktionsbedingungen können sie, gerade im Lebensmittelbereich, konventionelle Produkte verdrängen [AULMANN und STERZEL, 1996]; hier sei auf das japanische Patent für Mannosylerythritollipide als Backzutat in Mehl verwiesen [AKIRA et al., 1997]. Erwähnt sei hier auch die Nutzung nicht nur nativer mikrobieller Biotenside sondern auch durch Biokonversion mittels Einsatz von Enzymen wie Lipasen, Proteasen oder Glycosidasen hergestellte Glycolipide. Übersichtsartikel zu diesem Themenkreis stammen von VULFSON [1993], COULON und GHOUL [1998] sowie BEVINAKATTI und MISHRA [1999]. Ein weiterer schon erwähnter Vorteil der mikrobiellen Glycolipide gegenüber den APG's ist die Vielfalt an Kohlenhydraten oder ungewöhnlichen Fettsäuren, die aus ihnen gewonnen werden können. So haben z.B. lactonisierte Hydroxyfettsäuren das Potential als Duftstoff eingesetzt zu werden [LEMIEUX, 1953]. Weiterhin zeigen Wachsester, die aus ungewöhnlichen Hydroxyfettsäuren hergestellt werden, interessante grenzflächenaktive Eigenschaften in Bezug auf ihr Spreitungsverhalten und die Bildung stabiler Oberflächenfilme [STEFFEN, 1994; LOKOTSCH, 1994]. Auch die Zuckerkomponenten aus solchen Glycolipiden können von großem Interesse sein. So wird z.B. L-Rhamnose durch Hydrolyse der von *Pseudomonas aeruginosa* gebildeten Rhamnoselipide gewonnen und zur Synthese des Aromastoffes Furaneol[®] verwendet [LANG und WULLBRANDT, 1998].

Anwendungspotentiale eröffnen sich aber auch dort, wo die biologische Herkunft der Biotenside eine bessere Biokompatibilität und gute mikrobielle Abbaubarkeit verspricht [KESTING et al, 1996]. Diese Kriterien werden besonders bei großräumigen Eingriffen in die Natur gefordert, z.B. bei der tertiären Erdölförderung und der Dekontaminierung von ölhaltigen Arealen (Ölverschmutzung der Meere, Bodensanierung) [CZESCHKA, 1995; POREMBA et al., 1998; GUTNICK, 1994; FINNERTY, 1994]. Gerade in den 80iger Jahren wurden große Anstrengungen im Bereich des *in situ* Einsatzes von mikrobiellen Zellen und dem direkten Einsatz von Biotensiden zur Verbesserung der Erdölförderung unternommen [WAGNER et al., 1980, KOSARIC, 1996; SHENNAN und LEVI, 1987; KHIRE und KHAN, 1994].

Weiterhin sind besondere biologische Eigenschaften von Glycolipiden und ihrer derivatisierten Zucker beschrieben worden [HAFERBURG et al., 1986, LANG und WAGNER, 1993c]. So weisen viele ein ausgeprägtes antimikrobielles Potential gegen sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien auf [LANG und WAGNER, 1993b]. Immer interessanter wird die Wirkung von Biotensiden auf tierische und menschliche Zellen bzw. Zelllinien [KOSARIC, 1996]. So sind z.B. oligomere Zuckerbausteine aus Biotensiden in den letzten Jahren im Zusammenhang mit Prozessen wie Zellerkennung und Differenzierung identifiziert und somit immer mehr zu Ziel- und Leitstrukturen, auch in Hinblick auf ihre weitere chemische und enzymatische Modifikation, für die Pharmaka-Synthese geworden. Ungewöhnliche Zuckereinheiten, wie sie z.B. aus Mannosylerythritollipiden [SPÖCKNER et al, 1998], Pentasaccharidlipiden oder Glycoglycerolipiden [POWALLA et al., 1989; KIM et al. 1990; Wicke, 1999] gewonnen werden können, sind rein chemisch nur sehr schwer selektiv herzustellen [LIN et al., 1996, ICHIKAWA et al, 1992]. Eine weitere medizinische Eigenschaft von Glycolipiden wurde von Isoda [ISODA et al., 1997] beschrieben. Sie fanden, induziert von verschiedenen mikrobiellen Glycolipiden, eine Hemmung im Wachstum der menschlichen Leukämiezellen HL60. Anstatt einer Zellvermehrung wurde aufgrund einer Inhibierung der Proteinkinase C eine Differenzierung der Zellen beobachtet. Weiterhin produziert *Pseudomonas aeruginosa* mehrere extrazelluläre Virulenzfaktoren, zu denen auch Rhamnoselipide gehören [HOLST et al., 1996; STANISLAVSKY und LAM, 1997]. Ihnen werden cilostatische (Mikrotubuli betreffende) sowie Phospholipase-C-Aktivität steigernde Eigenschaften zugeschrieben [McCLURE und SCHILLER, 1992; READ et al., 1992]. Und

so gibt es eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten von Biotensiden, die in neuerer Zeit von verschiedenen Arbeitsgruppen in Hinsicht auf mögliche medizinische Anwendungen untersucht werden [BAER und WU, 1992; GORBACH et al, 1994; STANGHELLINI und MILLER, 1997].

Zielsetzung

Das Bakterium *Tsukamurella spec.* (DSM 44370), hervorgegangen aus der grundlegenden Arbeit von Vollbrecht [1999], wird als Produzent von Oligosaccharidlipiden auf der Basis nachwachsender Rohstoffe beschrieben. Aufbauend auf diesen Ergebnissen war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Glycolipidproduktion mittels einer zu entwickelnden und fehlerminimierten Analysemethode zu beschreiben und die Ausbeute durch geeignete Fermentationsprozessführung zu optimieren. Weiterhin sollten die nativen Produkte effizient aufgearbeitet und mittels chemischer und enzymatischer Methoden modifiziert werden, um ihre physikochemischen und biologischen Eigenschaften verändern zu können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Mikroorganismus

Der verwendete Stamm *Tsukamurella* spec. (DSM 44370) wurde im Rahmen eines Screenings nach Glycolipid produzierenden Mikroorganismen [HECKMANN, 1995] aus einer Bodenprobe isoliert und von der DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) über chemotaxonomische Merkmale und 16S-r-RNA-Gensequenzierung als *Tsukamurella* spec. nov. klassifiziert.

Tsukamurella gehört zu der weit verbreiteten Gruppe der mycolsäurehaltigen *Actinomyceten* (Abbildung 2.1) [GOODFELLOW, 1992; CHUN et al., 1996]. Es handelt sich um stäbchenförmige, unbewegliche, Gram-positive, aerob wachsende Bakterien, die in gelblich gefärbten, trockenen, rauen Kolonien wachsen. Weitere morphologische Merkmale und physiologische Eigenschaften wurden von Vollbrecht ausführlich dargestellt [VOLLBRECHT, 1999].

Tabelle 2.1 zeigt die Elementaranalyse der Zellmasse nach einer Kultivierungsdauer von 48h bei 30°C mit Sonnenblumenöl (ölsäurereich) als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Tabelle 2.1: Elementaranalyse der Zellmasse von *Tsukamurella* spec. (Institut für Pharmazeutische Chemie, Analytisches Labor, TU-Braunschweig)

Element	Anteil an der Biotrockenmasse [%]
Kohlenstoff	52.40
Stickstoff	3.88
Wasserstoff	8.06

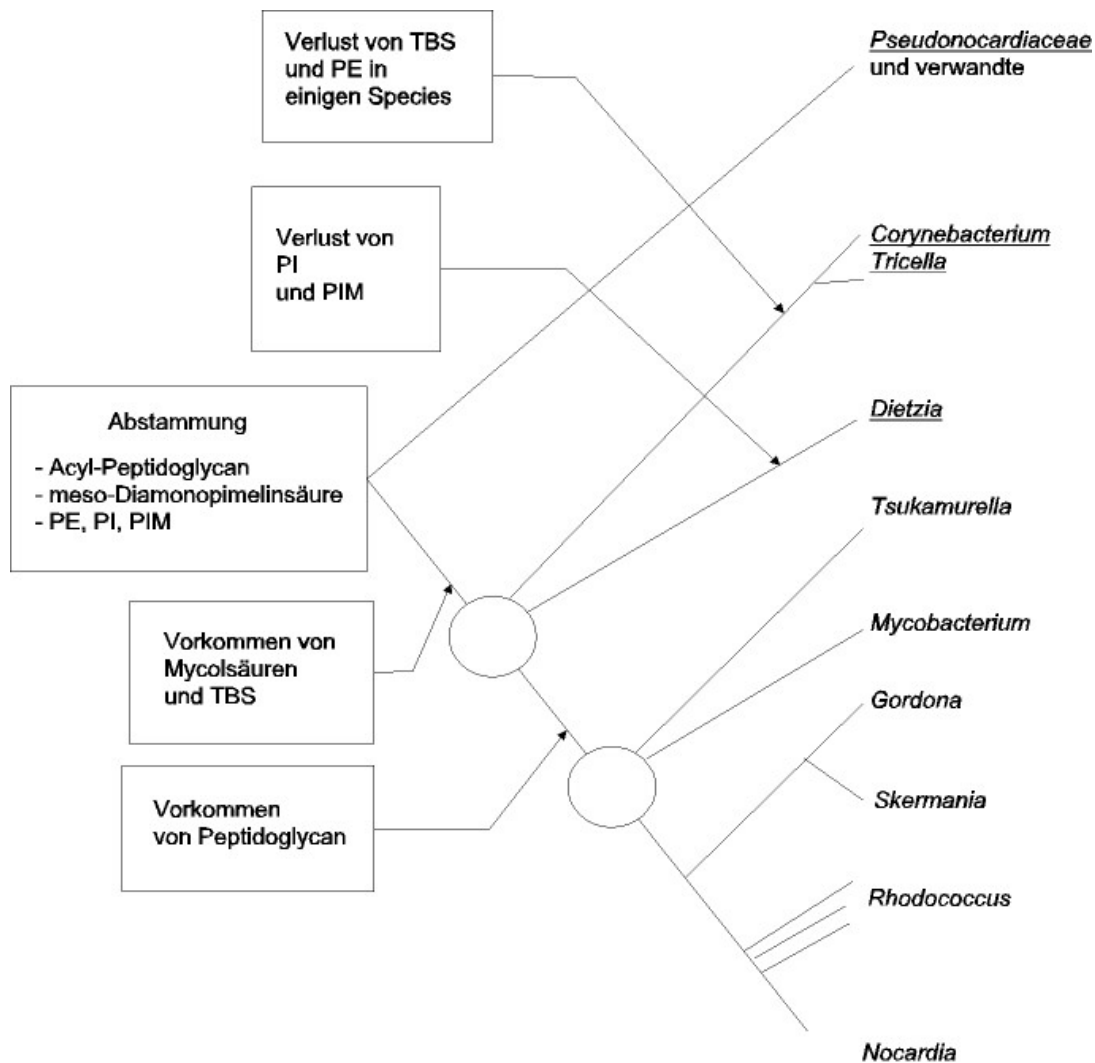


Abbildung 2.1: Evolutionärer Stammbaum für mycolsäurehaltige Actinomyceten auf der Basis von Daten zur 16S rRNA Gesequenz und Chemotaxonomie. [Collins et al., 1988, Goodfellow, 1992; Chun et al., 1996].
Abkürzungen: PE = Phosphatidylethanolamin; PI = Phosphatidylinositol; PIM = Phosphatidyl-inositol-mannosid; TBS = Tuberculosterarinsäure.

2.2 Chemikalien

Es wurden analysenreine Chemikalien (insbesondere Mineralsalze), Lösungsmittel und Enzyme der folgenden Firmen verwendet:

Merck, Darmstadt
Sigma Chemical Company, USA
Fluka Feinchemikalien GmbH, Ulm
Biomol, Hamburg
Roth, Karlsruhe
Riedel de Haën, Seelze
Novo Nordisk A/S

Daneben wurden folgende Substanzen als Mediumsbestandteile eingesetzt:

Sonnenblumenöl (C18:1)	Fa. Henkel, Düsseldorf
Rapsöl	"
Olivenöl	"
Calendulaöl	PPM, Magdeburg
Bacto Agar	Difco-Laboratories, Detroit/USA

2.3 Kulturführung

2.3.1 Stammhaltung

Zur Stammhaltung von *Tsukamurella* spec. wurden Agarkulturen mit NB-Fertigagar (Difco, Detroit/USA) verwendet. Der Stamm wurde alle acht Wochen neu auf Agarplatten überimpft, für 72 h bei 30°C inkubiert, luftdicht verschlossen und bei 4°C gelagert.

Für die eigene Stammhaltung von *Tsukamurella* spec. über einen längeren Zeitraum wurden zudem Stickstoffkonserven angelegt.

Stickstoffkonserve

Mehrere Impfösen der Biomasse von frisch beimpften gut bewachsenen Agarplatten wurden in 5 ml Lagermedium (10 % Glycerin (w/v) und 10 % Magermilchpulver (w/v) in wässriger Lösung) aufgeschlemmt, je 1.5 ml dieser Suspension in Plastikampullen pipettiert, bei -70°C 2 h vorgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.3.2 Nährmedien

Agarmedien:

1. NB-Agar (Bacto[®] Nutrient Broth); für Stammhaltung und antimikrobielle Tests

Bacto Beef Extract	3.0 g l ⁻¹
Bacto Pepton	5.0 g l ⁻¹
Bacto Agar	15.0 g l ⁻¹

2. MPY-Agar (für antimikrobielle Tests)

Malzextrakt	20.0 g l ⁻¹
Pepton (Fleisch)	2.5 g l ⁻¹
Hefeextrakt	2.5 g l ⁻¹
Agar	18.0 g l ⁻¹

3. CP-Agar (für antimikrobielle Tests)

Hefeextrakt	10.0 g l ⁻¹
Glucose	10.0 g l ⁻¹
Agar	10.0 g l ⁻¹

Submersmedien

Für die Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab (500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml und 2 l Erlenmeyerkolben mit 500 ml Arbeitsvolumen) und im Bioreaktor wurde, wenn nicht anders angegeben, folgendes Nährmedium verwendet:

4. Medium 1 (**M 1**):

(NH ₄) ₂ SO ₄	1.24 g l ⁻¹
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0.20 g l ⁻¹
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0.01 g l ⁻¹
Spurenelementelösung	3.00 ml l ⁻¹ (getrennt autoklaviert)
Puffer (Phosphat oder Tris/HCl) 1M	100.00 ml l ⁻¹ (getrennt autoklaviert)
Substrat (Sonnenblumenöl)	20.00 ml l ⁻¹
EDTA (Na-Salz • 2 H ₂ O)	0.25 g l ⁻¹

Zusammensetzung der Spurenelementelösung [HECKMANN, 1992]:

ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	0.148 g l ⁻¹
CuSO ₄ • 2 H ₂ O	0.025 g l ⁻¹
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	2.100 g l ⁻¹
MnSO ₄ • 1 H ₂ O	0.085 g l ⁻¹
CoSO ₄ • 7 H ₂ O	0.224 g l ⁻¹
NiSO ₄ • 6 H ₂ O	0.027 g l ⁻¹
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ • 7 H ₂ O	0.026 g l ⁻¹
H ₃ BO ₃	0.062 g l ⁻¹
KI	0.010 g l ⁻¹
EDTA (Na-Salz • 2 H ₂ O)	5.200 g l ⁻¹

In H₂O dest.; eingestellt auf pH 4

Zusammensetzung der Vitaminlösung [SCHLEGEL, 1992]:

Biotin	0.2 mg
Nicotinsäure	2.0 mg
Thiamin	1.0 mg
4-Aminobenzoat	1.0 mg
Pantothenat	0.5 mg
Pyridoxamin	5.0 mg
Cyanocobalamin	2.0 mg
H ₂ O dest.	100 ml

2.3.3 Sterilisation der Nährmedien und Substrate

Die Nährmedien wurden bei 121°C und 1 bar Überdruck 20 Minuten im Autoklav sterilisiert. Puffer-, Spurenelement- und Vitaminlösungen wurden separat autoklaviert und unter aseptischen Bedingungen den entsprechenden Medien zugesetzt.

2.3.4 Vorkulturen

Für die Vorkulturen zur Anzucht von Biomasse wurden Zellen von einer Agarplatte auf 100 ml steriles Medium überimpft und in einem 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen 72 h bei 30°C inkubiert.

2.3.5 Hauptkultur

Die Voruntersuchungen zur Mediumszusammensetzung und Wachstums-optimierung erfolgten als Submerskultivierungen im Doppelansatz in 500 ml bzw. 2 l Schüttelkolben mit zwei Schikanen, die 100 ml bzw. 500 ml Medium enthielten. Als Inokulum wurden jeweils 10% (v/v) der entsprechenden Vorkultur eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurde bei 30°C und 100 Upm auf einer Schüttelmaschine (B. Braun, International, Melsungen) kultiviert.

2.3.6 Bioreaktorkultivierungen

Untersuchungen zur Optimierung der Oligosaccharidlipid-Bildung in größerem Maßstab wurden in verschiedenen Bioreaktoren durchgeführt.

- **2 l Bioreaktor** der Firma Bioindustrie Montavane
- **10 l Bioreaktor** (Biostat C) der Firma B. Braun Biotech International (Melsungen)
- **30 l Bioreaktor** (Biostat P) der Firma B. Braun Biotech International (Melsungen)
- **50 l Bioreaktor** (Biostat E und Biostat U50B) der Firma B. Braun Biotech International (Melsungen)

Meß- und Regeleinheiten (bei 2 I nur teilweise)

- Drehzahl mit automatischer Registrierung
- Drucküberlagerte, sterilisierbare pH-Elektrode mit Grenzwertschalter und automatische Registrierung des pH-Wertes
- Säure- und Laugenzudosage über Schlauchpumpen
- Kühler und Dampffalle für die Abluft
- On-line Abgasanalyse mit Oxygor 6N für die Sauerstoffanalyse und Unor 6N für die Kohlendioxidanalyse (Maihak, Hamburg)
- Schumacher-Sterilfilter und regelbares Rotameter für die Zuluft
- Sterilisierbare, polarographische Sauerstoffelektrode mit on-line Registrierung (Ingold AG, Zürich)
- Sterilisierbares Handprobenahmeventil
- automatisches Probenahmesystem mit Kühlung auf 3°C
- Pumpe zur Nachdosage von Substrat und Antischaummittel
- Füllstandsmeßsystem zur Detektion der Schaumbildung mit automatischer Substrat/Antischaummittel-Zudosage
- Temperaturregelkreis mit Thermofühler PT 100 und Thermostat mit Kühlwasserkreislauf

Kultivierungsbedingungen

Für die durchgeführten Kultivierungen wurden, wenn in Kapitel 3.3 nicht anders angegeben, folgende Bedingungen gewählt:

- | | |
|-----------------------|---|
| • Rührsystem: | Rushton Turbinen |
| • Drehzahl | 900 Upm |
| • Belüftungsrate | 0.4 v/vm |
| • Temperatur | 30°C |
| • pH | 7.5; geregelt durch Zugabe von 10%iger NaOH |
| • Schaumunterdrückung | mechanisch; Zugabe von Substrat |

Der Reaktor wurde in situ für 20 Minuten bei 1 bar Überdruck und 121 °C sterilisiert. Die Probenahme erfolgte je nach Kultivierung im Abstand von ca. 1-8 h zur Bestimmung der Kultivierungsparameter (Kapitel 2.4).

2.3.7 Immobilisierung der Biomasse

Suspendierte Biomasse wurde zur Immobilisierung mit einer 3 % (w/w) wässrigen Alginatlösung (Manugel DJX) homogen verrührt (Ansatz: BFM/Wasser/Alginatlösung; 2/1/5; w/w/w). Dieser Ansatz konnte anschließend mittels einer Immobilisierungsapparatur tropfenweise in eine langsam gerührte 2 % (w/w) wässrige CaCl_2 -Lösung überführt werden. Nach 15 Minuten in der Vernetzerlösung waren die Perlen ausgehärtet und konnten eingesetzt werden.

2.4 Kultivierungsparameter

2.4.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Biotrockenmasse wurde in Doppelansätzen gravimetrisch bestimmt. 10 ml Kultursuspension wurden, um an den Zellen haftende Substratreste (Pflanzenöl) zu entfernen, zusammen mit 10 ml eines Lösemittelgemisches (n-Butanol/Ethanol 1:1 v/v) in einen gewogenen Metallzentrifugenbecher gegeben und vorsichtig mit dem Vortex vermischt. Zentrifugiert wurde in einer Labofuge 15000 (Heraeus/Christ, Osterode) bei 13000 Upm, einer Temperatur von 4°C für 30 min. Der zellfreie Überstand wurde dekantiert, das Pellet im Metallbecher bei 110°C im Trockenschrank für 48h getrocknet und anschließend im Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut ausgewogen.

2.4.2 Bestimmung der Lipaseaktivität

Die Lipaseaktivität wurde photometrisch mit Hilfe von p-Nitrophenyl-palmitat nach Winkler und Struckman [WINKLER AND STRUCKMAN, 1979] bestimmt. Aus dem eingesetzten Substrat wird mittels der Lipase p-Nitrophenol freigesetzt, welches im alkalischen Milieu photometrisch bei einer Wellenlänge von 410 nm bestimmt werden kann.

Die Substratlösung wurde jeweils frisch durch Mischen von Lsg. I und Lsg. II im Verhältnis 9/1 hergestellt. Sie wurde auf dem Vibromix so lange kräftig durchmischt, bis eine stabile Emulsion entstand.

Lösung I	207 mg Natriumdeoxycholat 100mg Gum arabicum in 90 ml 0.05 M Phosphatpuffer, pH 8
----------	---

Lösung II	30 mg p-Nitrophenylpalmitat in 10 ml Isopropanol
-----------	---

2.4 ml der Substratemulsion wurden auf 37°C vortemperiert, mit 100 µl zellfreiem Kulturüberstand vermischt und bei 37°C für 5 min inkubiert. Gemessen wurde gegen einen enzymfreien Blindwert.

2.4.3 Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Quantitative Bestimmung nach Fawcett und Scott [FAWCETT AND SCOTT, 1960]

20 µl des abzentrifugierten Kulturüberstandes wurden mit 500 µl Lösung I vermischt und die Reaktion durch Zugabe von 500 µl Lösung III gestartet. Die Proben wurden 16 min bei 37°C und anschließend 15 min bei RT inkubiert

Die Extinktion der Reaktionsansätze wurde bei einer Wellenlänge von 548 nm gemessen. An Hand einer mit Ammoniumchlorid erstellten Kalibriergerade im Bereich von 0.04-0.4 g l⁻¹ konnte die Ammoniumkonzentration errechnet werden.

Lösung I	9.98 g l ⁻¹ Phenol 50.6 mg l ⁻¹ Nitroprussid (Natriumsalz) in H ₂ O dest.
Lösung II	0.5 ml 13%ige Natriumhypochloridlösung 24.4 ml H ₂ O dest.
Lösung III (frisch angesetzt)	20 ml l ⁻¹ Lösung II 5.0 g l ⁻¹ NaOH in H ₂ O dest.

Bemerkung:

Aufgrund der Emulsionsbildung im Verlauf der Kultivierung von *Tsukamurella spec.* durch die produzierten Glycolipide kommt es zu einer Trübung der Reaktionslösung, die Einfluss auf die Extinktionsmessung hat. So sind die gemessenen Ammoniumkonzentrationen nur bis zum Erreichen der stationären Phase, in der die Überproduktion der Glycolipide beginnt, verlässlich.

Halbquantitative Bestimmung

Zur schnellen Abschätzung der Ammoniumkonzentration während der Kultivierung kam der Ammonium-Test Merckoquant[®] 10024 (Merck) zum Einsatz. Dem Test liegt die spezifische Reaktion nach Nessler zugrunde.

2.4.4 Bestimmung der Phosphatkonzentration

Die Bestimmung der Phosphatkonzentration im Kulturüberstand erfolgte semiquantitativ mittels eines Stäbchentests (Merckoquant[®] Phosphat-Test (PBM) 10428, Merck, Darmstadt) durch visuellen Vergleich der Reaktionszone des Analysestäbchens mit einer Farbskala.

Eine quantitative Bestimmung wurde mit dem Spectoquant[®] Phosphor-Test (PBM) 14848 (Merck, Darmstadt) durchgeführt.

2.4.5 Proteinbestimmung

Zellaufschluss nach NÄVEKE und TEPPER [1986]

1 ml Kultursuspension wurden 15 min bei 13000 Upm und einer Temperatur von 4°C in einer Biofuge A (Heraeus, Osterode) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet mit Hilfe von Glasperlen (Durchmesser 0.75 mm) in 1 ml 1 N Natronlauge resuspendiert und bei 95° C für 20 min im Thermoblock inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die gesamte Suspension am Vortex intensiv durchmischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Proteinbestimmung nach LOWRY [1951] eingesetzt.

Proteinbestimmung nach LOWRY [1951]

Lösung I, II und III wurden im Verhältnis 100/1/1 gemischt. 1 ml dieser Lösung und 100 µl Proteinlösung wurden zusammengegeben und bei 30° C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Lösung IV zupipettiert und weitere 30 min bei 30° C inkubiert. Die Extinktionen der Lösungen wurden bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen. Der Proteingehalt der Proben konnte anhand einer mit Rinderserumalbumin im Konzentrationsbereich von 0.05 – 0.5 g l⁻¹ erstellten Kalibriergeraden ermittelt werden.

Lösung I	20 g l ⁻¹ Na ₂ CO ₃ in 0.1 NaOH
Lösung II	10 g l ⁻¹ CuSO ₄ · 5 H ₂ O in dest. H ₂ O
Lösung III	20 g l ⁻¹ K-Na-Tatrat in dest. H ₂ O
Lösung IV	Folin-Reagenz, 1/1 mit dest. H ₂ O verdünnt

2.4.6 Proteinbestimmung trägerfixierter Biomasse

Zur Bestimmung der immobilisierten Biomasse auf Trägermaterialien wurde in dieser Arbeit das durch Buchtmann weiterentwickelte Verfahren der Bestimmung des DNA-Gehaltes nach Raebel und Schlierf angewendet [BUCHTMANN, 1996].

Die für das Testverfahren notwendigen Reagenzien wurden nach Dische [DISCHE, 1955] und Raebel und Schlierf [RAEBEL und SCHLIERF, 1980] hergestellt.

Reagenz I	Trichloressigsäure(TCE), 4.98 %(w/w)
Reagenz II	Diphenylaminreagenz nach Dische: 2.0 g Diphenylamin + 98 ml Eisessig + 2 ml konz. Schwefelsäure

Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden die BTM-Werte von verschiedenen Proben mit unterschiedlichen Biomassekonzentrationen ermittelt. Von den gleichen Proben wurden je zweimal 10 ml in Glaszentrifugenbechern bei 10000 g zentrifugiert, die Überstände dekantiert und die Pellets sofort in 1 ml Trichloressigsäure mittels eines Ultraschallbades resuspendiert. Nach einem 30 minütigen Zellaufschluss und dem Hinzufügen von 1.25 ml Diphenylaminreagenz erfolgte eine 15 minütige Erhitzung auf 90°C. Nach einer definierten Abkühldauer auf Raumtemperatur von einer halben

Stunde wurde wieder für 15 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand konnte dann bei 595 nm vermessen werden. Die Korrelation zwischen BTM und Extinktion ergab die Kalibrierungsgerade.

Zur Bestimmung der trägerfixierten Biomasse war es erforderlich, die bewachsenen Trägermaterialien in 1 ml Trichloressigsäure zu suspendieren. Die folgenden Arbeitsschritte waren die gleichen wie bei der Erstellung der Kalibrierungsgeraden.

2.4.7 Bestimmung des Substrates (Triglyceride und Fettsäuren) über HPLC

Zur Bestimmung der Substratkonzentration kamen zwei unterschiedliche HPLC-Anlagen zum Einsatz; neben der hier beschriebenen auch die HPLC-Anlage zur Bestimmung der Glycolipidzusammensetzung (Kapitel 2.4.8).

Die Proben (Kapitel 2.5.1) wurden mit MTBE verdünnt und der Triglyceridgehalt mittels HPLC bestimmt. Zur Kalibrierung wurde das jeweils verwendete Öl in einem Konzentrationsbereich von 0.2 – 1.0 g l⁻¹ eingesetzt und ein Summenparameter über alle Peaks erstellt (Abbildung 2.2) [STOLYHWO et al., 1985, WINTER et al., 1993].

HPLC-System zur Konzentrationsbestimmung der Triglyceride:

- Laufmittel	isokratisch, Chloroform/Acetonitril, 30/70 (v/v)
- Fluß	1 ml min ⁻¹
- Trennsäule	ET 250/3 NUCLEOSIL® 120-5C ₁₈ , Macherey und Nagel, Germany
- Detektor	Evaporative Light Scattering Detector, Varex MKII, Alltech Associated Inc. Deerfield, USA
- Temp.	85°C
- SLPM	2.7
- Gasvordruck	3 bar
- Probenaufgabe	HPLC Autosampler, PROMIS II, SPARK, Holland
- Integrator	Chromatopac C-R3A, SHIMADZU Deutschland GmbH, Duisburg
- Pumpe	Jasco 880-PU, JASCO, Japan

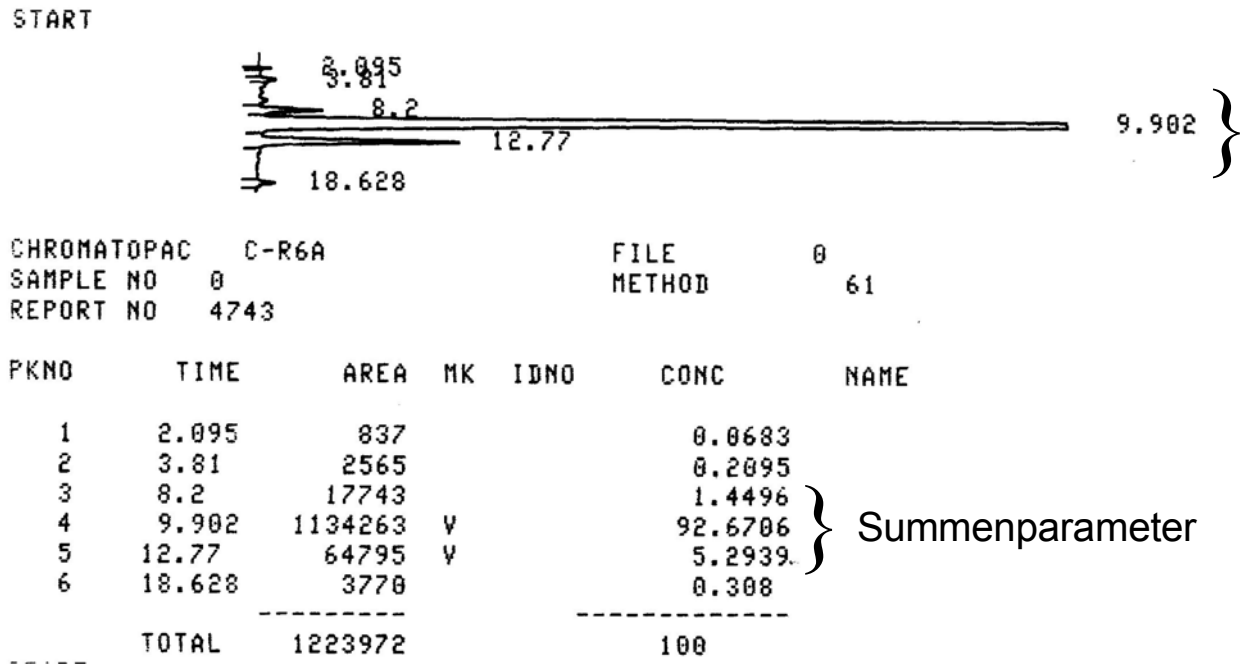


Abbildung 2.2 HPLC-Chromatogramm von Sonnenblumenöl

2.4.8 Bestimmung der Glycolipide

Quantitative Dünnschichtchromatographie

Die Bestimmung der Glycolipidkonzentration und der Glycolipidzusammensetzung erfolgte zum einen über eine quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen an einem rechnergesteuerten Densitometer CD 60 der Firma Desaga (Heidelberg).

Hierzu wurden die Proben (Kapitel 2.5.1) im Abstand von 1 cm mit einer Hamilton-Spritze auf eine Kieselgel-DC-Folie aufgetragen, entwickelt und mit α -Naphthol-Sprühreagenz angefärbt (Kapitel 2.9.1). Als Laufmittel für die NP-Alufolie wurde Chloroform/Methanol/Wasser im Verhältnis 65/15/2 (v/v/v) verwendet. Anschließend wurden die einzelnen Probehahnen über die Fläche und Farbintensität der Spots ausgewertet. Über eine mitgeführte Konzentrationsreihe von Standardproben konnte eine Kalibrierung vorgenommen werden.

Bestimmung per HPLC

Die Entwicklung einer geeigneten Methode zur Bestimmung der Glycolipidzusammensetzung und der Glycolipidkonzentration in den gewonnenen Proben mittels HPLC war ein wichtiger Teil dieser Arbeit (Kapitel 3.2) und wird detailliert dargestellt. Hier werden die verwendeten Materialien, Geräte und Betriebsbedingungen aufgelistet.

- Laufmittel	Gradientensysteme: Chloroform/Methanol, Wasser/Methanol, Chloroform/Acetonitril
- Fluß	1 ml min ⁻¹
- Trennsäule	HPLC-Fertigsäule, NUCLEOSIL [®] 100-5 (250 x 4.6 cm) CS-Chromatographie Service, Germany HPLC-Fertigsäule, NUCLEOSIL [®] 120-5C ₁₈ (250 x 4.6 cm) CS-Chromatographie Service, Germany
- Detektor	CAS 750/14 Lichtstreuendetektor
- Temp.	55-120°C
- Gasvordruck	3 bar
- Probenaufgabe	HPLC Autosampler, PROMIS II, SPARK, Holland
- Integrator	Chromatopac C-R3A, SHIMADZU Deutschland GmbH, Duisburg
- Pumpen	2 x Jasco 880-PU, JASCO, Japan
	Beckmann System Gold, NEC PC 8300 110B Solvent Delivering Modul Analog Interface Modul
- Mixer	Spark Dynamik+Static+HPLC-Mixing-Chamber, SPARK, Holland
- HPLC-Software	Andromeda V1.7, Data System, Data Apes. Ltd.

2.4.9 Abgasanalyse

Die Volumenprozentage an Kohlendioxid und Sauerstoff im Bioreaktorabgas wurden kontinuierlich durch ein Abgasanalysegerät der Firma Maihak (Hamburg) gemessen. Vor jeder Kultivierung wurden die Messgeräte mit einem Gasgemisch definierter Zusammensetzung (Fa. Linde, Hannover) kalibriert.

Mit der Annahme, dass sich die Zuluft nur aus den Gasen Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff in konstanter Konzentration zusammensetzt, kann durch die Messung des Abluftstromes und mit den gegebenen Prozessgrößen die Sauerstoff-

aufnahmerate Q_{O_2} und die Kohlenstoffbildungsrate Q_{CO_2} berechnet werden. Für die Berechnung wird eine quasistationäre Inertgasbilanz über die ein- und austretenden Gasvolumenströme vorausgesetzt [EINSELE et al., 1985]. Es wird dabei ein differentiell kleiner Zeitbereich betrachtet, indem die Biomassenänderung vernachlässigbar ist.

Die nachfolgend dargestellten Bilanzgleichungen gelten jedoch nur für folgende Annahmen:

- Das Gasgemisch verhält sich ideal
- Die Zuluft besteht nur aus N_2 , O_2 , CO_2
- Die Gasströme sind auf den Normalzustand bezogen ($p^N = 1\text{bar}$, $T^N = 273.15\text{ K}$) und trocken
- Stickstoff passiert den Reaktor als inerter Bestandteil
- CO_2 ist das einzige gasförmige Stoffwechselprodukt
- Der Zuluftstrom ist konstant und bekannt

$$Q_{O_2} = \frac{\dot{V}^N \cdot p^N \cdot x_{O_2}^E \cdot MG_{O_2}}{R \cdot T^N \cdot V_R} \cdot \left[1 - \frac{x_{O_2}^A \cdot (1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E)}{x_{O_2}^E \cdot (1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A)} \right]$$

Gleichung 1

$$Q_{CO_2} = \frac{\dot{V}^N \cdot p^N \cdot x_{CO_2}^E \cdot MG_{CO_2}}{R \cdot T^N \cdot V_R} \cdot \left[\frac{x_{CO_2}^A \cdot (1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E)}{x_{CO_2}^E \cdot (1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A)} - 1 \right]$$

Gleichung 2

mit:

\dot{V}^N	Volumenstrom der Zuluft unter Normbedingungen
MG	Molekulargewicht
R	allgemeine Gaskonstante
x_i^A, x_i^E	Molenbruch der Komponente i im Gasaustritt bzw. im Gaseintritt
p^N	Gasdruck unter Normbedingungen
V_R	Reaktorvolumen
T^N	Temperatur unter Normbedingungen

Mit diesen beiden gemessenen Raten, der CO_2 -Bildung und des O_2 -Verbrauches lässt sich der respiratorische Quotient RQ nach Gleichung 3 berechnen. Er dient vor allem zur Beurteilung der Art der Substratverwertung.

$$RQ = \frac{Q_{CO_2}}{Q_{O_2}} \cdot \frac{MG_{O_2}}{MG_{CO_2}}$$

Gleichung 3

Ein an die Abgasanalytik angeschlossener PC speicherte in regelmäßigen Abständen die Daten vom Abgasstrom (Vol% CO₂, Vol O₂, Q_{O_2} , Q_{CO_2} , RQ und die dazugehörige Kultivierungszeit). Der auf dem Abgasrechner unter dem Betriebssystem MS DOS 6.0 (Fa. Microsoft Corporation, München) installierte Abgasmanager wurde 1992 von Gura [GURA, 1992] entwickelt und ausführlich beschrieben.

2.4.10 Ausbeutekoeffizienten

Der Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$ stellt das Verhältnis von Zellmassenbildung zu Substratverbrauch pro Zeiteinheit dar. Der Ertragskoeffizient setzt sich aus dem Verbrauch an Substrat für Zellwachstum und Erhaltungsstoffwechsel zusammen.

$$Y_{X/S} = \frac{\text{Biomassebildung}}{\text{Substratverbrauch}} = \frac{c_X(t_1) - c_X(t_0)}{c_S(t_1) - c_S(t_0)}$$

Gleichung 4

Der Produktausbeutekoeffizient $Y_{P/S}$ ist der Quotient aus Produktbildung und Substratverbrauch.

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Produktbildung}}{\text{Substratverbrauch}} = \frac{c_P(t_1) - c_P(t_0)}{c_S(t_1) - c_S(t_0)}$$

Gleichung 5

Beide Ertragskoeffizienten werden in der Praxis häufig zur Ermittlung der Effizienz verwendet. Im Mittelpunkt steht dabei die Umwandlung der Edukte in Biomasse und vor allem in die gewünschten Produkte.

Bei der Prozessoptimierung ist weiterhin die Produktbildung pro Biomasse $Y_{P/X}$ sowie die Produktbildungsrate P_V von Bedeutung.

$$Y_{P/X} = \frac{\text{Produktbildung}}{\text{Biomassebildung}} = \frac{c_P(t_1) - c_P(t_0)}{c_X(t_1) - c_X(t_0)}$$

Gleichung 6

$$P_V(t) = \frac{c_P(t_1) - c_P(t_0)}{t_1 - t_0}$$

Gleichung 7

Die Produktbildungsrate gibt die differentielle Änderung der gebildeten Masse an dem gewünschten Produkt pro Zeiteinheit [kg h^{-1}] an. Wird die Produktbildungsrate auf das bei der Kultivierung zur Verfügung stehende Volumen bezogen, so erhält man die volumetrische Produktivität oder auch Raum-Zeit-Ausbeute [$\text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$]; siehe Gleichung 7.

2.5 Aufarbeitung

Die Aufarbeitung der Kultursuspensionen zur Gewinnung größerer Mengen der nativen Glycolipide wird in Kapitel 3.4 bei den Optimierungsversuchen detailliert besprochen.

2.5.1 Probenaufarbeitung

3 ml Kultursuspension wurden dreimal mit jeweils 3 ml t-Butylmethylether in einem verschließbaren Zentrifugenröhrchen extrahiert. Nach dem Zentrifugieren bei 4°C und 15000 Upm für 10 min wurden die organischen Phasen vereinigt. Nach entsprechender Verdünnung konnte der Substratgehalt und gegebenenfalls die Glycolipidkonzentration mit den in Kapitel 2.4 beschriebenen Methoden bestimmt werden.

2.5.2 Präparative Schichtchromatographie

Sowohl im Rahmen der down-stream Prozessentwicklung als auch zur Isolierung der durch enzymatische Modifizierung erhaltenen Produkte wurde das Verfahren der Dickschichtchromatographie eingesetzt. Dabei wurden PSC-Fertigplatten (20x20 cm) (Kieselgel F₂₅₄, Art. 1.05717, Fa. Merck, Darmstadt, sowie SIL RP-18W/UV₂₅₄ der Firma Macherey-Nagel, Frankfurt) verwendet. Maximal 100 mg der zu trennenden Substanzgemische wurden linienförmig mit Hilfe einer Pasteurpipette oder einer Hamiltonspritze aufgetragen und mit dem, je nach Trennproblem geeignetem Laufmittel entwickelt. Die Detektion der Banden erfolgte nach dem Trocknen durch Ansprühen eines schmalen vertikalen Streifens mit α -Naphthol Reagenz (Kapitel 2.9.1) und anschließendem Erhitzen mit einem Heißluftfön. Die gewünschten Banden wurden von der Platte abgetragen, fein zermörsert und mit einem geeigneten Lösungsmittelgemisch mehrere Male eluiert. Nach Abrotieren des Lösungsmittels am Rotaionsverdampfer wurden die erhaltenen Produkte mittels Dünnschichtchromatographie auf ihre Reinheit überprüft.

2.5.3 Flash-Säulenchromatographie

Für eine erste Anreicherung der Glycolipide und zur groben Abtrennung der Substrate wurde die Flash-Chromatographie mit Kieselgel 60 gewählt.

- Aufgegebene Extraktmenge: 5 – 10 g
- Stationäre Phase: Merck® Kieselgel60
- Mobile Phase: MTBE; Methanol
- Säulenfüllung: 200 – 500 g Kieselgel

2.5.4 MPLC

Zur gezielten Isolierung einzelner Komponenten des nativen Glycolipidgemisches und zur Aufreinigung der durch enzymatische Modifizierung erhaltenen Produkte kam neben den anderen genannten Methoden ebenfalls die Mitteldruck-Flüssigkeits-Chromatographie zum Einsatz.

-Probenmenge:	0.1 – 3 g
-Säulen:	Merck® Lobar® Glasfertigsäulen Büchi-Chromatographiesäulen
-Stationäre Phase:	Merck® Kieselgel 60; Merck® LiChrospher® 100 RP-18
-Mobile Phase:	Chloroform/Methanol/Wasser (65/15/2) Chloroform/Methanol (4/1)
-Pumpe:	Büchi
-Volumenstrom:	0.5 -3.0 ml min ⁻¹
-Detektor:	UV-Licht (280 nm)

2.6 Chemische und biochemische Methoden zur Modifikation der Glycolipide

2.6.1 Alkalische Verseifung der Glycolipide

Zur Gewinnung der Kohlenhydratgrundgerüste der Glycolipide wurden sowohl die aufgereinigten Glycolipide als auch das Glycolipidgemisch in einer 0.5 N NaOH 4h unter Rückfluss erhitzt, abgekühlt und mit 0.5 N HCl neutralisiert [LOKOTSCH, 1994]. Durch Zugabe von Methanol konnte der größte Teil an NaCl bereits durch Filtration abgetrennt werden. Die abgespalteten Fettsäuren wurden durch Extraktion mit MTBE (dreimal) aus dem polaren Wasser/Methanol-Gemisch entfernt. Das Methanol wurde anschließend am Rotationsverdampfer unter verminderten Druck (250 mbar; T = 40°C) abgezogen und der Rückstand gefriergetrocknet. Das hydrolysierte Rohprodukt wurde zunächst über einen Kationenaustauscher (DOWEX 50WX8) und nach erneuter Gefriertrocknung über einen Anionenaustauscher (DOWEX 2X8, Fa. Serva) aufgereinigt.

2.6.2 Enzymatische Umsetzungen

Im Laufe dieser Arbeit wurden viele unterschiedliche Modifikationsversuche an den nativen Glycolipiden und an den Zuckergrundgerüsten durchgeführt. Die einzelnen Bedingungen werden detailliert in Kapitel 3.5 besprochen. Hier werden nur die Standardansätze beschrieben, die neue Substanzen lieferten, an denen weiterführende Untersuchungen durchgeführt wurden.

Sowohl die enzymatische Acylierung der einzelnen Glycolipide als auch die enzymatische Acylierung der Zuckerkomponenten wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben, die mit einer PTFE-Dichtung verschlossen waren, durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in einem temperierbaren Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 55 °C und einer Schüttelfrequenz von 100 Upm.

Der Standardansatz für die enzymatische Acylierung der einzelnen Glycolipide lautet:

Glycolipd (GL1, GL2, GL3)	100 mg
Fettsäurekomponente	100 µl
Lipase	100 mg Novozyme 435 aus <i>Candida antarctica</i>
Lösungsmittel	50 ml MTBE (getrocknet)
Trocknungsmittel	2 g aktiviertes Molsieb
Reaktionsdauer	24-72 h

Der Standardansatz für die enzymatische Acylierung der Zuckergrundgerüste lautet:

Kohlenhydrate(G1, G2, G3)	100 mg
Enzym	100 mg Novozyme 435 aus <i>Candida antarctica</i>
Lösungsmittel	50 ml Methyl-tert-butylether / Pyridin (1/1)
Reaktionsdauer	24-96 h
Trocknungsmittel	2 g aktiviertes Molsieb

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Enzym-Immobilisat über Faltenfilter abfiltriert und dreimal mit MTBE gewaschen. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter verminderten Druck am Rotationsverdampfer abgezogen, in ein geeignetes Lösungsmittel aufgenommen und die einzelnen Substanzen per Extraktion, präparativer Schichtchromatographie oder MPLC aufgereinigt.

2.7 Physikalische Methoden

2.7.1 Oberflächenspannung

Die Messung der Oberflächenspannung erfolgte mit Hilfe eines Lauda Tensiometers (MGW Lauda, Königshofen), welches nach der Ringmethode von DU NOÜY arbeitet. Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen der Glycolipide bzw. deren Gemische in dest. Wasser hergestellt. Etwa 20 ml dieser Lösungen wurden in temperierbare Glasgefäße gefüllt und der Einfluss der Glycolipide auf die Oberflächenspannung bestimmt [BREZESINSKI UND MÖGEL, 1993].

Ein Platin-Ring wird dabei ca. 0.5 cm unter die Flüssigkeitsoberfläche der Tensidlösung getaucht und während der Messung langsam aus der Flüssigkeit herausbewegt. Die Oberfläche übt auf den Ring eine Zugkraft aus, so dass dessen Gewichtskraft größer wird. Bevor es zu einem Abriss der Flüssigkeitslamelle vom Ring kommt, erfährt der Ring ein Kraftmaximum. An diesem Punkt steht die Lamellenoberfläche senkrecht zum Ring. Vor dem Abrisspunkt schnürt sich die Lamelle ein, so dass die Zugkraft wieder abnimmt. Das Tensiometer kann den Punkt der maximalen Kraftwirkung registrieren und senkt den Ring wieder in die Lösung ab, so dass es nicht zu einem Abriss der am Ring hängenden Lamelle kommt. Dieser Messzyklus wurde solange wiederholt und mittels eines Schreibers permanent aufgezeichnet, bis eine konstante Kraft gemessen wurde.

Die Oberflächenspannung ist definiert als Kraft, die pro Längeneinheit wirkt. Das heißt, die hier gemessene Kraft in Abhängigkeit vom Ringumfang entspricht der Oberflächenspannung. Da die vom Ring angehobene Flüssigkeitslamelle zwei Oberflächen hat, muss die gemessene Kraft mit einem Faktor $\frac{1}{2}$ multipliziert werden. Diese Werte wurden vom Gerät berechnet und mussten mit einem Faktor korrigiert werden [HARKINS und JORDAN, 1930], der den Auftrieb des Ringes in der Flüssigkeit berücksichtigt.

2.7.2 Emulsionstest und HLB-Wert

Emulsionsstabilität

Durch Messung der optischen Dichte einer Emulsion mit einem Spektralphotometer (UV-1100, Fa. Hitachi) bei 623 nm wurde das Emulsionsvermögen der Glycolipide untersucht [MULTZSCH, 1995; SCHULZ, 1992].

Es wurden 1 mg Testsubstanz in 4 ml äußerer Phase gelöst und nach Zugabe von 100 µl innerer Phase 1 min intensiv auf dem Vibromix durchmischt. Die Abnahme der Trübung wurde über drei Stunden auf einem Schreiber registriert.

Tabelle 2.2: Testansätze zur Bestimmung des Emulsionsvermögens

System	Äußere Phase (4.0ml)	innere Phase (0.1 ml)
Öl in Wasser (Ö/W)	dest. H ₂ O	Sonnenblumenöl
		Kerosin
		Mineralöl
Wasser in Öl (W/Ö)	Sonnenblumenöl	dest. H ₂ O
	Kerosin	
	Mineralöl	

HLB-Wert Bestimmung

Es sind verschiedene Systeme zur Klassifizierung von Emulgatoren entwickelt worden, die dem Anwender einen Anhaltspunkt für die Emulgatorenauswahl geben sollen. Eines der gebräuchlichsten und am besten ausgearbeiteten Systeme ist das HLB-System nach Griffin [HEUSCH, 1993; GRIFFIN, 1954]. Der HLB-Wert (Hydrophilic Lipophilic Balance) ist eine rechnerisch oder empirisch bestimmbare Größe, die eine Aussage über das molare Verhältnis von hydrophilen und hydrophoben Molekülanteilen gibt.

Jedem Emulgator ist eine dimensionslose Zahl im Bereich von 0 bis 20 zugeordnet, die eine Beschreibung von Tensideigenschaften erlaubt. Öllösliche hydrophobe Emulgatoren, deren hydrophober Anteil überwiegt, besitzen HLB-Werte unter 10, während hydrophile wasserlösliche Tenside Werte zwischen 11 und 20 erhalten. Bei einem Wert von 10 liegt das hydrophile-lipophile Gleichgewicht. Dort ist der

Emulgator zwischen beiden Phasen gleichmäßig orientiert, so dass sein hydrophober Teil in der Ölphase und sein hydrophiler in der wässrigen Phase lokalisiert ist. Im Idealfall lässt sich der HLB-Wert eines Emulgators nach Gleichung 8 berechnen.

$$HLB = 20 \cdot \frac{M_H}{M}$$

Gleichung 8

M_H	Molekulargewicht des hydrophilen Molekülteils
M	Gesamt-molekulargewicht des Tensids

Um die Emulgatora Auswahl zu erleichtern, wurden den zu emulgierenden Substanzen ebenfalls HLB-Werte zugeordnet.

Bei ionischen, verzweigten oder mehrkettigen Tensiden kann diese einfache Berechnung nicht angewendet werden. Da letzteres bei den untersuchten Glycolipiden zutraf, wurde der HLB-Wert experimentell mit einem System aus Sojaöl (HLB 6) und Cyclohexan (HLB 15) in unterschiedlichen Verhältnissen bestimmt. Für jedes dieser Gemische lässt sich der erforderliche HLB-Wert für Ö/W-Emulsionen nach Gleichung 9 berechnen. Der HLB-Wert, bei dem das eingesetzte Substanzgemisch am besten emulgiert wurde, entsprach dem HLB-Wert des Tensids.

$$A = \frac{(HLB_{\text{erf.}} - HLB_B)}{(HLB_A - HLB_B)} \quad B = 1 - A$$

Gleichung 9

$HLB_{\text{erf.}}$	= erforderlicher HLB-Wert	A	= Anteil Cyclohexan am Gemisch
HLB_A	= HLB von Cyclohexan (15)	B	= Anteil Sojaöl am Gemisch
HLB_B	= HLB von Sojaöl (6)		

2.8 Biologische Methoden

2.8.1 Agardiffusionstest

Um das Wirkspektrum der isolierten und modifizierten Glycolipide zu ermitteln, wurde ein Plättchentest [DIN 58940] mit unterschiedlichen Testorganismen durchgeführt (Normenausschuß Medizin, 1989). Tabelle 2.3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Testorganismen und die entsprechenden Test-Bedingungen.

Auf eine Agarplatte wurde ein steriles Testplättchen (6 mm Rundfilter) aseptisch aufgelegt und die in DMSO gelösten Substanzen in verschiedenen Konzentrationen (0-300 µg pro Plättchen; 10 µl der Lösung je Plättchen) aufpipettiert. Die Platten wurden ca. 2 h bei RT inkubiert, um den Substanzen die Möglichkeit zu geben, in den Agar zu diffundieren. Anschließend wurden die Platten mit wässrigen Zellsuspensionen (mehrere Impfen der Kulturen in 0.89 %iger NaCl-Lösung) der Testorganismen besprüht und inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Hemmung des Wachstums der Testorganismen im Bereich des Plättchens ausgewertet.

Tabelle 2.3: Testbedingungen für den Agardiffusionstest in Abhängigkeit vom verwendeten Testorganismus

Testorganismus	Agarmedium	Inkubations- temperatur [°C]	Inkubations- dauer [h]
<i>Bacillus megaterium</i>	NB-Agar	30	24, 16*
<i>Escherichia coli</i>	NB-Agar	30	24, 16*
<i>Staphylococcus aureus</i>	NB-Agar	30	24, 16*
<i>Mycobacterium violaceum</i>	MPY-Agar	27	72
<i>Ustilago violacea</i>	MPY-Agar	27	72, 24-72*
<i>Mycothypha microspora</i>	MPY-Agar	27	72
<i>Chlorella fusca</i>	CP-Agar	20	24 hell

*Inkubationsdauer für den Röhrchentest (Kapitel 2.8.2)

Bezugsquelle: DSMZ, ATCC

2.8.2 Röhrchentest zur Bestimmung des IC_{50} - und MHK-Wertes

Mit Hilfe des Röhrchentests konnte die minimale Hemmkonzentration (MHK) und die Wirkstoffkonzentration ermittelt werden, bei der 50%ige Wachstumshemmung (IC_{50} -Wert) eintrat. Die Methode wurde entsprechend des Bouillon-Dilutionstests [DIN 58940 Teil 5] durchgeführt (Normenausschuß Medizin, 1989).

Reagensglas-Ansätze im Doppelansatz:

2 ml	Kulturmedium (Kapitel 2.3.2, nur ohne Agarzugabe)
40 µl	DMSO –Testsubstanzlösung (Verdünnungsreihe)
0.1 ml	Vorkultur des Testorganismus

Nach entsprechender Zeit (Tabelle 2.3) wurde der Effekt auf das Wachstum der Testorganismen durch Messung der optischen Dichte bei 623 nm oder, wenn die Lösung durch Zugabe der Testsubstanz bereits getrübt war, durch Auszählen der Zellzahl in einer Thoma-Kammer verfolgt. Als Referenz für vollständige Wachstumshemmung wird ein Ansatz mit Inokulum bei 4°C inkubiert.

Die Wirkstoffkonzentration, bei der die Keimzahl des Referenzansatzes erreicht wurde, entspricht dem MHK-Wert. Der IC_{50} -Index ergab sich aus der Konzentration, bei der die Hälfte der Keimzahl des Ansatzes, der ohne Testsubstanz inkubiert wurde, erreicht war.

2.8.3 Externe biologische Aktivitätstests

Zusätzlich zu den eigenen Untersuchungen wurden folgende Tests auf biologische Aktivität an den in Tabelle 2.4 aufgeführten Instituten durchgeführt:

Tabelle 2.4: Externe Tests auf biologische Aktivität

Institut	Test
KTB Tumorforschungs GmbH, Institut für Molekulare Medizin und Naturstoffforschung, Dr. Schächtele	Hemmung bzw. Aktivierung von Protein-kinasen (Tab. 2.6)
Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto (Japan), Dr. Tokuda	Anti-Tumor-Promoting-Activity
Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Hannover, Dr. Zakaeria	Antiviraler Assay, humane Fibroblasten (A549) auf Resistenz gegen den Encephalomyocarditis-Virus, Quantifizierung von Interferon Aktivitäten
Institut für Physiologische Chemie, Abt. für angewandte Molekularbiologie, Universität Mainz, Prof. Dr. Müller	Zytotoxizitätstests gegenüber Tumorzellen L5178Y
Institut für allgemeine Pharmakologie, MH Hannover, Prof. Dr. Beil	Zytotoxizitätstests gegenüber HM02 (Magencarcinom) und HEP-G2 (Lebercarcinom)

Tabelle 2.5 zeigt die im Test eingesetzten Proteinkinasen und skizziert kurz ihre Funktion innerhalb des Organismus.

Tabelle 2.5: Proteinkinasen und ihre biologische Funktion [SCHÄCHTELE, 2000].

Proteinkinase	Funktion
<i>Cyclin-dependent Kinase 4 und Cyclin-dependent Kinase 2</i>	Regulation von Zellwachstum und Zellteilung (Zellzyklus)
Tyrosinkinase des b-Rezeptors des <i>Platelet-derived Growth Factor</i>	Signalleitung von Wachstumssignalen
Tyrosinkinase des Rezeptors für den <i>Epidermal Growth Factor</i> und Tyrosinkinase des <i>ErbB2-Rezeptors</i>	In verschiedenen Tumoren überexprimiert
Tyrosinkinase des Rezeptor-1 des <i>Fibroblast Growth Factor</i>	Beteiligung des FGF-Rezeptorsystems an der Tumorangiogenese
Tyrosinkinase des Insulin-like Growth Factor Rezeptor, Typ1 und Tyrosinlinase des Insulin-Rezeptors	Regulation des programmierten Zelltodes
Proteinkinase C, Subtyp g und Subtyp e	Proteinkinase C ist der intrazelluläre Rezeptor für verschiedene tumorunterstützende Chemikalien
Janus-Kinase 2	Spielt eine Rolle bei der Cytokin-vermittelten Signalleitung

2.9 Analytische Methoden

2.9.1 Dünnschichtchromatographie

Zur schnellen und einfachen qualitativen und quantitativen Analyse der Zusammensetzung und Reinheit sowohl der nativen Glycolipide als auch der neuen produzierten Substanzen kam die Dünnschichtchromatographie zum Einsatz. Dazu wurden als stationäre Phasen NP- (Normal Phase) und RP- (Reversed Phase) Fertigplatten mit Fluoreszenz-Indikator verwendet.

- NP: DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm, Merck (Darmstadt)
- RP: DC-Alufolien, RP-18 F₂₅₄, Merck (Darmstadt)

Als Laufmittel wurden unterschiedliche Lösemittelmischungen eingesetzt entsprechend dem jeweiligen Trennungsproblem. Die Mischungen sind jeweils bei den einzelnen Ergebnissen dokumentiert.

Die Substanzbanden wurden nach der Entwicklung durch Ansprühen mit α -Naphthol-Reagenz sichtbar gemacht. Glycolipide wurden als dunkelviolette, Fettsäuren als rosa und Öle als gelbe oder bräunliche Banden nach kurzzeitigem Erhitzen der Karte auf 180°C sichtbar.

Tabelle 2.6: Sprühreagenz [STAHL, 1967]

Reagenz	Zusammensetzung
α -Naphthol-Lösung	10.5 ml α -Naphthol-Lösung (15 %ig in Ethanol) 6.5 ml konz. Schwefelsäure 40.5 ml Ethanol 4 ml Wasser

2.9.2 Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung erfolgte mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und Massenspektrometrie (MS).*

Kernspinresonanzspektroskopie

Es wurden an einem 300° K Bruker ARX 400 und PPX 600 Spektrometer ^1H -NMR-Standardspektren und ^1H -breitbandentkoppelte ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen. Zur genaueren Zuordnung der ^1H -NMR- und der ^{13}C -NMR-Signale wurden für alle Substanzen zweidimensionale (H,H)- und (C,H)-korrelierte Spektren (COSY) aufgenommen. In allen Fällen wurden Chloroform/Methanol-Gemische (jeweils deuteriert) als Lösungsmittel benutzt.

Massenspektrometrie

Negative und positive Elektrospray Massenspektren (ESI-MS) wurden auf einem Finnigan-MAT TSQ 700 vierfach Quadrupol Massenspektrometer aufgenommen.

* Wurden an der GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig) von Herrn Dr. V. Wray und Herrn Dr. M. Nimtz durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Produktzusammensetzung und Strukturaufklärung

Heckmann [1995] und Vollbrecht [1999] beschrieben erstmals die Synthese von drei unterschiedlichen Hauptgruppen von extrazellulären Glycolipiden durch den Stamm *Tsukamurella* spec.. Diese drei Hauptgruppen unterscheiden sich in dem Aufbau ihres Zuckergrundgerüsts und werden danach benannt und unterteilt. Jede Hauptgruppe beinhaltet an sich aber ein Gemisch an verschiedenen Glycolipiden mit dem selben Zuckergrundgerüst aber mit verschiedenen Acylsubstituenten. Durch die Kombination von ^1H -, ^{13}C -NMR und positiven und negativen ESI-Massenspektren, sowie MS-MS-Spektren war es möglich, die Strukturen dieser nativen Oligosaccharidlipide aufzuklären. Vollbrecht [1999] beschreibt im Detail den Strukturaufbau.

Die Strukturen der in dieser Arbeit durch Kultivierung auf Sonnenblumenöl isolierten Glycolipide wurden ebenfalls untersucht. Zum einen um mögliche Abweichungen gegenüber den vorangegangenen Arbeiten zu analysieren, zum anderen um Vergleichsdaten für die Identifizierung der weiter unten beschriebenen Modifizierungsprodukte zu erhalten. Die Daten der erhaltenen ^1H -, ^{13}C -NMR- sowie der MS-Spektren sind in Kapitel 6.1 aufgelistet. Sie beinhalten bereits veröffentlichte sowie durch ergänzende Untersuchungen erweiterte Strukturdaten. Ein Unterschied zu den von Vollbrecht [1999] veröffentlichten Strukturen konnte nicht gefunden werden.

Die drei Glycolipide sind wie folgt aufgebaut. Zur einfacheren Unterscheidung werden die einzelnen Zuckerbausteine mit den Buchstaben A bis D benannt.

Die erste Hauptgruppe, die von der Komplexität einfachste Gruppe der Glycolipide, ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Das Glycolipidgemisch GL 1 und GL 1B enthalten als Grundstruktur Trehalose, bestehend aus zwei 1,1- α -glycosidisch verknüpften Glucose-Einheiten, als Zuckergerüst. Der Unterschied besteht nur in der Anzahl und Art der gebundenen Acylreste. Bei GL 1 handelt es sich um ein Gemisch aus mindestens vier Glycolipiden mit jeweils zwei unterschiedlichen Fettsäureanteilen. An

Position C-3 der Glucose-Einheit B sind Kettenlängen zwischen zwei und sechs Kohlenstoffatomen vorhanden, während in Position C-2 längere Ketten mit sechzehn oder achtzehn C-Atome vorkommen. GL1 B leitet sich als strukturell eng verwandte Verbindung von GL 1 ab. Es besitzt einen weiteren Acylsubstituenten (Octadecensäure) an der Glucose-Einheit A.

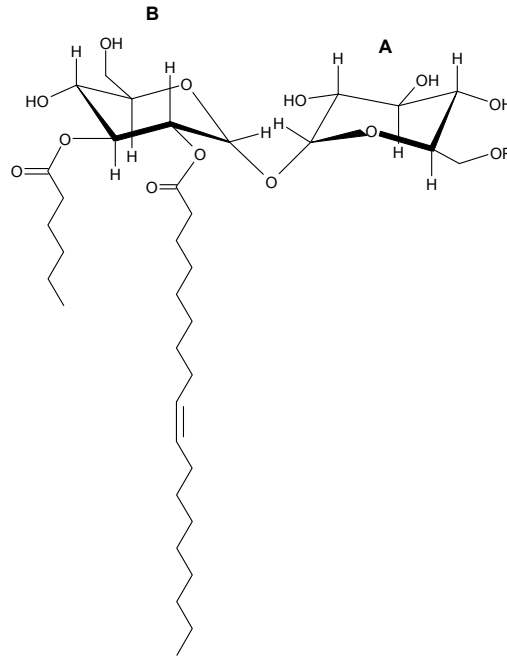


Abbildung 3.1: Struktur des Glycolipidgemisches GL 1 und GL 1B mit den Zuckern A und B. R=H bei GL 1; R=Octadecansäure. bei GL 1B

Das Zuckergrundgerüst von GL 2 (Abbildung 3.2) besteht ebenfalls aus Trehalose, an die (2'-1'')- β -glycosidisch eine weitere Glucose-Einheit gebunden ist. Dieses Trisaccharidlipid ist vierfach substituiert und zeigt ein einheitliches Acylsubstituentenspektrum.

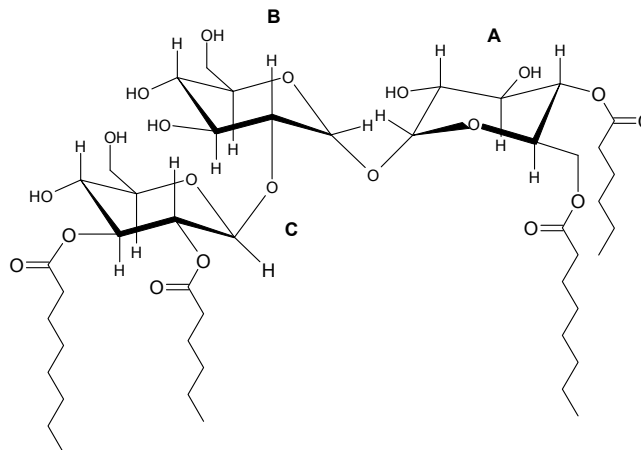


Abbildung 3.2: Struktur von Glycolipid GL 2 mit den Zuckern A, B und C.

Aufbauend auf GL 2 befindet sich bei GL 3 in 6'-Position zusätzlich eine 1,6- β -glycosidisch gebundene Galactose-Einheit. Das Fettsäurespektrum von GL 3 stellt sich etwas komplexer dar. Es sind ebenfalls kurze Kettenlängen zwischen sechs und acht Kohlenstoffatomen vertreten. Zusätzlich werden aber gesättigte und ungesättigte Reste nachgewiesen. Weiterhin sind auch asymmetrische Verteilungen der Fettsäuren auf beiden Glucose-Einheiten (A und C) möglich (Abbildung 3.3).

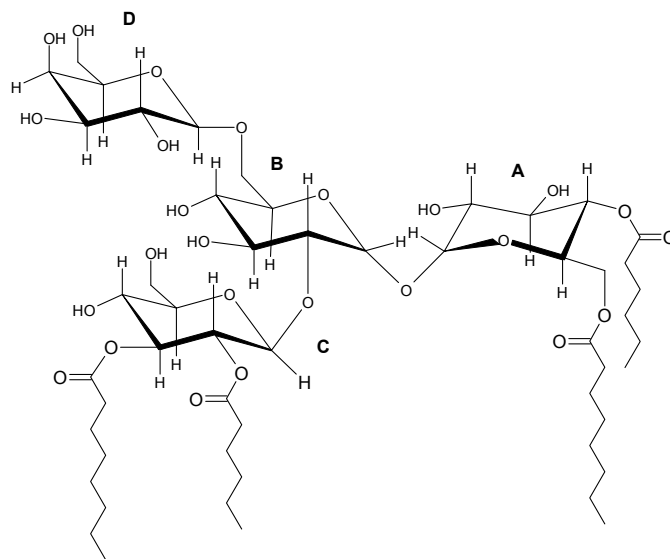


Abbildung 3.3: Struktur des Glycolipidgemisches von GL 3 mit den Zuckern A, B, C und D.

3.2 HPLC-gestützte Substrat- und Produktbestimmung

Das in früheren Arbeiten [VOLLBRECHT, 1999] benutzte Verfahren der Dünnschichtchromatographie mit anschließender Konzentrationsbestimmung über Densitometrie erwies sich als nicht reproduzierbar und sehr fehleranfällig. Deshalb war es notwendig, zur Bestimmung der Produktkonzentration eine neue Analysemethode mittels HPLC zu entwickeln, die zuverlässige Ergebnisse liefert.

Die Ungenauigkeit der alten Probenaufarbeitung und Analyse lässt sich an folgenden Fehlerquellen darstellen:

a) Densitometrische Bestimmung der Glycolipidkonzentration

Abbildung 3.4 zeigt eine DC von einer aufgereinigten Probe der Kultursuspension nach dem im Kapitel 2.4.8 beschriebenen Verfahren. Die Kultivierung erfolgte auf Sonnenblumenöl als alleinige C- und Energiequelle. Die Entwicklung auf Kieselgel ergibt eine Auftrennung nach den polaren Zuckergrundgerüsten der einzelnen Glycolipide.

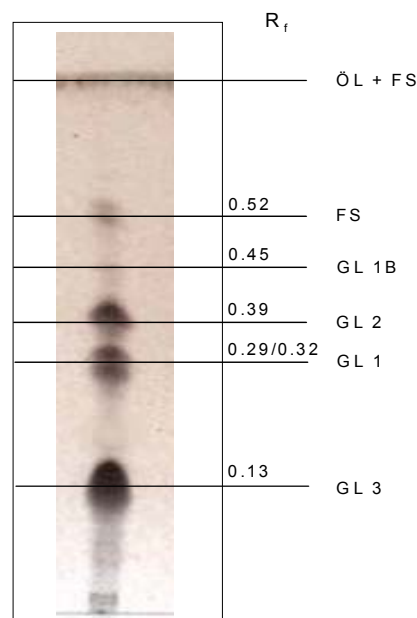


Abbildung 3.4: Auftrennung des auf Sonnenblumenöl gebildeten Glycolipidgemisches mittels NP-Dünnschicht, Laufmittel (Chloroform/Methanol/Wasser; 65/15/2; v/v/v)

Mit α -Naphthol als Detektionsmittel zeigten sich vier sehr deutliche, dunkle zuckerpositive Spots. Direkt oberhalb der Glycolipide befand sich ein Gemisch aus freien Fettsäuren, bestehend aus Palmitinsäure, Ölsäure, Stearinsäure und Arachidonsäure. Weitere freie Fettsäuren und das sich in der Probe befindliche restliche Öl bewegte sich direkt mit der Lösemittelfront.

Die einzelnen Glycolipidbanden auf der NP-DC wurden anschließend in einem Densitometer quantitativ vermessen. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit dieser Methode waren mit relativ großen Fehlern behaftet, die durch die folgenden Punkte beschrieben werden:

- manuelle Auftragung der Substanzen
- manuelle Auftragung der Sprühreagenzien
- keine einheitlichen Trocknungszeiten
- keine parallele Entwicklung der Proben
- Spotbreite größer als die Abtastbreite des Densitometers

b) Probenaufarbeitung

- keine erschöpfende Aufarbeitung nach dreimaliger Extraktion mit MTBE 1/1 (v/v) bei hohen Glycolipid- und/oder Biomassekonzentrationen.
- Bei nicht vollständiger Phasentrennung mehrmaliges Extrahieren notwendig.

c) Probenentnahme

- Schwierige Probenentnahme im Dreiphasensystem (Öl, Biomasse, Medium)
- keine repräsentative Probenentnahme durch Auf flottierung der Biomasse im Bioreaktor und Biomasseaufwuchs an den Glasrändern bei Schüttelkolbenkultivierung
- Abhängigkeit der Glycolipidkonzentration von der Biomassekonzentration (Kapitel 3.3.5.1)

Die beiden letzten genannten Punkte sind natürlich unabhängig von der eigentlichen Analyse methode der Glycolipide. Bei der Entwicklung einer neuen Methode wurde aber jeder Schritt auf etwaige Fehlerquellen untersucht und konnte dementsprechend bei den weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden.

3.2.1 HPLC-Analytik

3.2.1.1 Glycolipidbestimmung

Aufbauend auf den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie wurde eine Quantifizierungsmethode mittels HPLC gesucht. Dazu wurden folgende zur Auswahl stehenden Komponenten zur Lösung des Trennproblems hin untersucht:

a) Detektortyp

- **UV-Vis:** Überlagerung des Lösemittelpeaks mit dem Signalpeak.
- **RI:** Empfindlich gegenüber Temperatur- und Druckschwankungen. Nicht geeignet für Gradientensysteme.
- **-Lichtstreuendetektoren:** erwiesen sich als am besten geeignet für dieses Trennproblem. Sie zeigten für die zu untersuchenden Substanzen eine ausreichend gute Signalempfindlichkeit.

Abbildung 3.5 zeigt bei Verwendung eines Lichtstreuendetektors den Zusammenhang zwischen Peakfläche und verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Glycolipide. GL 1 weist hierbei die größte Signalstärke auf, obwohl es im Verhältnis zu GL 3 das kleinste Zuckergrundgerüst besitzt. Ein Vergleich mit den eingesetzten Edukten (Öl und Fettsäuren) zeigte, dass diese eine ebenfalls sehr hohe Signalstärke aufweisen (vgl. Abbildung 3.7). Das ließ den Schluss zu, dass die Größe des Acylsubstituenten einen höheren Einfluss auf die Signalstärke der einzelnen Glycolipide hat als die Größe ihres Zuckergrundgerüsts.

Ein Nachteil der Lichtstreuung ist die Verdampfung der mobilen Phase. Die getrennten Substanzen können nicht wie bei UV- und RI-Detektoren in die Vorlage zurückgeführt werden und stehen daher auch nicht für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Um das Grundrauschen bei diesem Detektortyp zu minimieren erfolgte die Parametereinstellung der Luftstrommenge und der Verdampfungstemperatur je nach verwendetem Laufmittel. Gerade die Verdampfungstemperatur ist entscheidend für eine stabile Grundlinie und damit für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Diese ist aber sehr unterschiedlich zu wählen je nach verwendetem Lösungsmittelgemisch. Besonders großen Einfluss zeigte hierbei die Verwendung von Wasser. Bei einem Gradientensystem mit unterschiedlichen Wasser-

konzentrationen ist eine Temperaturänderung von bis zu $\pm 30^\circ\text{C}$ erforderlich. Da aber keine gradientengestützte Temperaturregelung zur Verfügung stand, musste ein geeignetes Laufmittel ohne Änderung der Wasserkonzentration entwickelt werden.

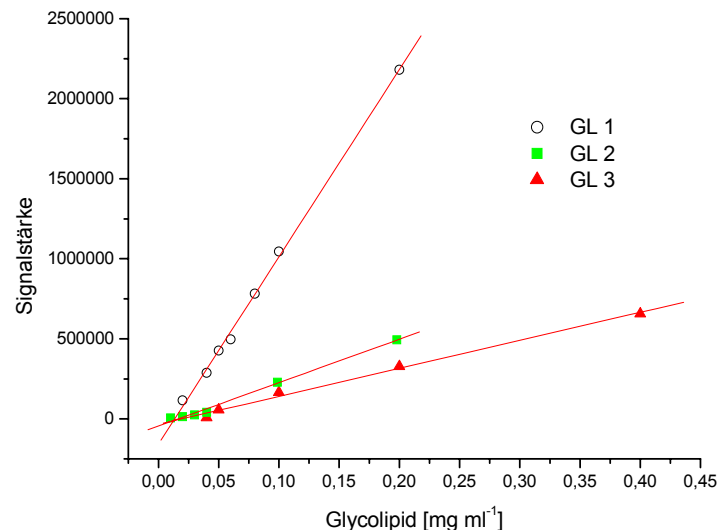


Abbildung 3.5: Signalstärken verschiedener Glycolipidkonzentrationen im Lichtstreuendetektor.

b) Trennsäule

- **Kieselgel 60:** Entsprechend NP-DC. Trennung nach den Zuckergrundgerüsten möglich.
- **RP-18 Materialien:** Keine entsprechende Trennung nach dem Zuckeranteil der Glycolipide.

c) Laufmittelsystem

Die Verwendung einer NP-HPLC-Säule (Chromatographie Service Nucleosil® 100) mit einem isokratischen Elutionsmittel (Chloroform/Methanol/Wasser, 65/15/2, v/v/v) erbrachte im Gegensatz zur Dünnschichtchromatographie kein befriedigendes Ergebnis. Auch andere Lösungsmittelgemische, isokratisch eingesetzt, zeigten keine eindeutige Trennung der Lipide. Die Trennung war entweder unvollständig oder aber die Peaks liefen zu weit. Es zeigte sich, dass bei einem isokratischen System nur in Gegenwart von Wasser einzelne Peaks zu detektieren waren; ohne Wasser liefen die Peaks ineinander und es erfolgte keine scharfe Trennung.

Durch die unbefriedigenden Ergebnisse mit isokratischen Systemen wurden weitere Untersuchungen mit einem Gradientensystem durchgeführt. Wie aber schon oben angeführt, war der Einsatz von Wasser im Elutionsmittel für eine schärfere Trennung nicht mit der Verwendung des Lichtstreuendetektors vereinbar.

Für die untersuchten Kriterien Trennleistung, Auflösungsvermögen und Analysedauer erwies sich die Kombination aus Lichtstreuendetektor, einer Kieselgel 60-Säule und dem Laufmittel Chloroform/Methanol mit dem Gradienten A (Tabelle 3.1) am besten geeignet. Die Flussrate betrug maximal 1.0 ml min^{-1} . Höhere Flussraten waren nicht möglich, da es bei dem gewählten Laufmittelgemisch zu nicht vertretbaren Druckanstiegen im System kam.

Abbildung 3.6 zeigt das Chromatogramm bei dem verwendeten Gradienten A. Es ist zu erkennen, dass mit diesem System sogar die beiden Komponenten GL 1B und GL1 voneinander getrennt werden konnten. Die unpolaren Substanzen (Öl und freie Fettsäuren) sowie polare Zellbruchstücke störten die Analytik nicht und die einzelnen Peaks waren gut voneinander getrennt.

Tabelle 3.1: Gradient A

Zeit [min]	Chloroform [%]	Methanol [%]	Fluß [ml min^{-1}]
0.00	100	0	1
1.01 - 18.00	100 - 69	0 - 31	1
18.01	0	100	1
19.00	0	100	1
19.01	100	0	1
23.00	100	0	1

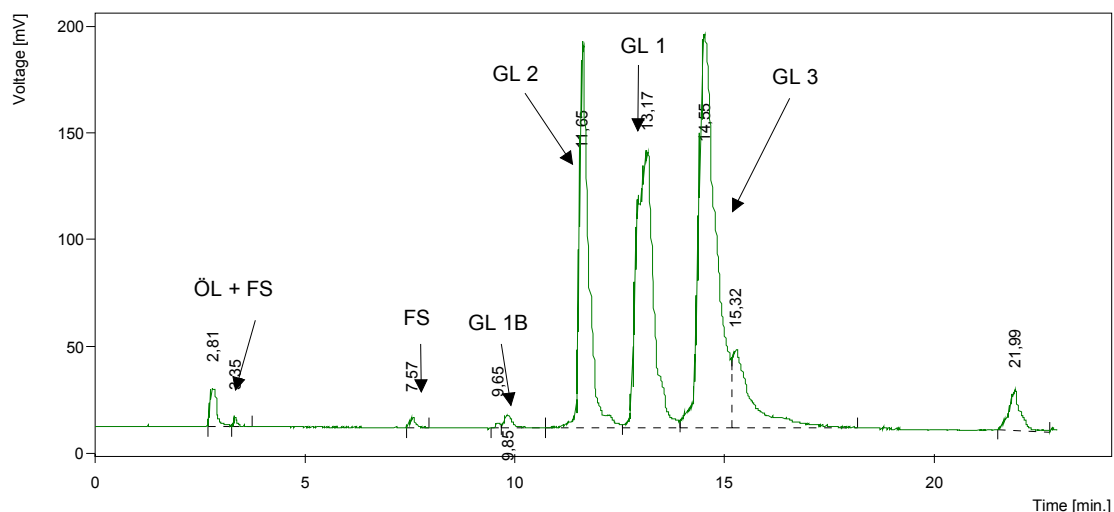


Abbildung 3.6: Chromatogramm bei Verwendung des Gradienten A

3.2.1.2 Fettsäuren und Triglyceridbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der eingesetzten Öle in den Proben stand die in Kapitel 2.4.7 beschriebene Methode zur Verfügung. Allerdings ließ sich darüber nur der Triglyceridgehalt bestimmen. Eine Angabe über den Gehalt an freien Fettsäuren oder sogar über die Art der enthaltenen Fettsäuren ließ diese HPLC-Analytik nicht zu.

Es zeigte sich, dass die verwendete Methode bei der Bestimmung der Glycolipide alleine schon durch die beschriebene, vor dem Gradienten eingeführte, unpolare isokratische Elution (vgl. Gradient A), ausreichte, um die Öl- und Fettsäurekonzentration zu bestimmen. Weiterhin konnten sogar einzelne freie Fettsäuren bestimmt werden (s. Abbildung 3.7). Insbesondere bei Verwendung von ölsäurereichen Substraten war die Detektion der freien Ölsäure in den Proben sehr hilfreich.

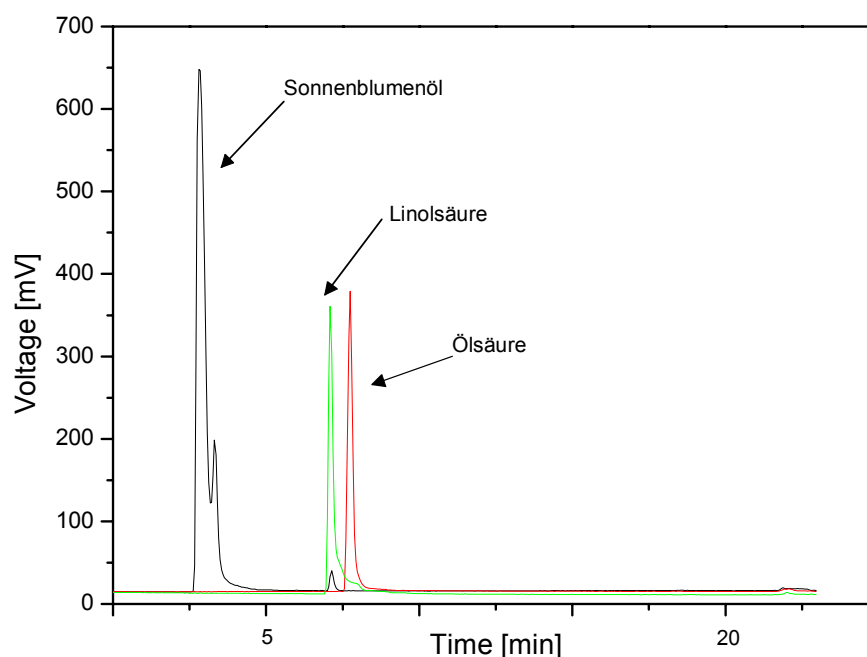


Abbildung 3.7: Chromatogramm der Edukte: Sonnenblumenöl und einzelne freie Fettsäuren.

3.3 Optimierung der mikrobiellen Glycolipidproduktion

Aufbauend auf den Untersuchungsergebnissen aus vorangegangenen Arbeiten sollen hier Optimierungsversuche zur Produktionssteigerung im Schüttelkoben- und Bioreaktormaßstab insbesondere mit Sonnenblumenöl als C-Quelle beschrieben werden.

Folgende Kultivierungsparamter wurden als optimiert vorausgesetzt [VOLLBRECHT, E., 1999]:

- Kultivierungstemperatur: 30°C
- pH-Optimum: 7.5
- zweiwertige Kationen: 0.2 g l⁻¹ Magnesiumsulfat; 0.01 g l⁻¹ Calciumchlorid
- Stickstoffquelle: Ammoniumsulfat
- Phosphatquelle: Natriumdihydrogenphosphat
- Substratspektrum: Wachstum und Glycolipidproduktion auf einer Vielzahl von hydrophoben Substanzen; insbesondere auf Pflanzenölen (Ölsäurereiches Sonnenblumenöl)

Die vorangegangenen Arbeiten hatten gezeigt, dass eine Überproduktion an Glycolipiden erst in der stationären Phase unter limitierenden Bedingungen erreicht werden konnte. Auf dieser Grundlage wurden hier geeignete Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolbenmaßstab mit wachsenden und ruhenden Zellen untersucht, die dann in den Bioreaktormaßstab zu übertragen waren. Auf Grund der starken Schaumentwicklung im Bioreaktor hatte das Fed-batch Verfahren bisher gute Ergebnisse geliefert [VOLLBRECHT, 1999]. Erste Untersuchungen unter limitierenden Bedingungen wurden deshalb ebenfalls als Fed-batch durchgeführt.

3.3.1 Puffersystem

Während des Wachstums fand eine starke Säurebildung statt, unter anderem weil aus dem Triglycerid des Substrates enzymatisch Fettsäuren freigesetzt wurden. Für die Untersuchungen im Schüttelkolbenmaßstab ist deshalb eine gute Pufferung des Systems notwendig. Die Schüttelkolbenversuche und die Anzucht der Vorkulturen für die Bioreaktoren erfolgten bei den Voruntersuchungen in Phosphatpuffer mit einer

Konzentration 100 mmol l^{-1} . Mit diesem System konnte unter geeigneten Bedingungen eine Biomasse von bis zu 4 g l^{-1} und eine Glycolipidkonzentration von bis zu 1 g l^{-1} erreicht werden (s. Tabelle 3.2). Für Untersuchungen zur phosphatlimitierten Kulturführung war es allerdings ungeeignet, da mit dem Phosphatpuffersystem immer ein Phosphatüberschuss angeboten wurde.

Für den pH-Bereich um 7.5 wurde für diesen Einsatz ein Trispuffer mit einer begrenzten Natriumdihydrogenphosphat-Quelle gewählt. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3.2 dargestellt. Der Trispuffer wurde von *Tsukamurella spec.* toleriert; allerdings lag die Pufferkapazität unter der des Phosphatsystems. Das Absinken des pH-Wertes erklärt auch die geringere Biomassebildung und damit das Ausbleiben einer Stickstofflimitierung (im Gegensatz zu den Phosphatansätzen). Hierdurch war auch keine bzw. nur eine geringe Glycolipidbildung bei den Ansätzen zu beobachten. Zur Anzucht eines phosphatfreien Inokulums war dieses System allerdings geeignet. Zu erkennen ist ebenfalls, dass bei einer Erhöhung der Phosphatkonzentration zwar ein besseres Wachstum stattfand, die Glycolipidbildung allerdings deutlich reduziert war. Im Gegensatz dazu konnte bei einer Erhöhung der Pufferkapazität des Trissystems sowohl ein geringes Wachstum als auch eine verminderte Glycolipidbildung beobachtet werden.

Tabelle 3.2: Kultivierung in verschiedenen Puffersystemen. Schüttelkolbenmaßstab: 125 ml. Medium M1, C-Quelle 20 ml l^{-1} ölsäurereiches Sonnenblumenöl, Start pH: 7.5, 30°C , 100 Upm; Kultivierungsdauer 48h.

Puffersystem	Pufferkonzentration [mmol l^{-1}]	Phosphatkonzentration [mmol l^{-1}]	BTM [g l^{-1}]	Glycolipid [g l^{-1}]	pH-Wert am Ende der Kultivierung
Phosphat	100	100	4	1	7
Phosphat	200	200	7	0.5	7.5
Tris	100	200	2.5	0.5	6
Tris	200	200	1	Spuren	7

3.3.2 Kultivierung mit Zellen aus der stationären Phase

Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass nur geringe Mengen der Glycolipide (im wesentlichen nur GL 1) während der Wachstumsphase von *Tsukamurella spec.* gebildet werden. Die Überproduktion der Glycolipide erfolgt erst in der stationären

Phase unter limitierenden Bedingungen. Es wurden deshalb Versuche mit ruhenden Zellen durchgeführt, wobei sowohl freie Zellen als auch immobilisierte Zellen untersucht wurden. Der Einsatz der immobilisierten Zellen erfolgte mit dem Ziel der Erhöhung der Stabilität und einer Vereinfachung der Aufarbeitung der Kultursuspension.

Kultivierung mit freien ruhenden Zellen

Die Zellen wurden im Standard-Medium M1 mit Phosphatpuffer auf Sonnenblumenöl angezogen und nach Abschluss der Wachstumsphase (N-Limitierung) abzentrifugiert und mit isotonischer Salzlösung gewaschen. Anschließend wurden sie in N- bzw. N+P-freies Medium mit unterschiedlichen Pufferkonzentrationen überführt. Es sollte damit gleichzeitig der Einfluss einer Phosphatlimitierung auf die Glycolipidproduktion untersucht werden.

In Tabelle 3.3 sind die gebildeten Glycolipidmengen nach einer Kultivierungsdauer von 96 h aufgelistet. Es zeigte sich, dass die phosphatfreien Ansätze eine höhere Produktivität aufwiesen, was auf einen negativen Einfluss von Phosphat auf die Glycolipidbildung schließen lässt. Die größte Ausbeute konnte mit 2.2 g l^{-1} Glycolipid ($Y_{P/S} = 0.2$) bei der geringsten Pufferkonzentration erzielt werden. Allerdings ist die Zunahme der Glycolipidkonzentration zwischen 0.1 und 0.01 mol l^{-1} Trispuffer eher gering. Während bei dem 0.1 mol l^{-1} Ansatz der pH-Wert im Verlauf der Kultivierung auf 5.5 sank, lag bei dem 0.01 mol l^{-1} Ansatz zum Ende der Inkubationszeit ein pH-Wert von 4.8 vor. Mikroskopisch konnte während der gesamten Kultivierungsdauer keine Infektion festgestellt werden.

Tabelle 3.3: Kultivierung von ruhenden Zellen von *Tsukamurella spec.* im Schüttelkolbenmaßstab. Substrat: Sonnenblumenöl 20 g l^{-1} . Inkubationszeit 96 h

Ansatz	eingesetzte Biofeuchtmasse [g l^{-1}]	Substrat- verbrauch [g l^{-1}]	gebildete Glycolipide [g l^{-1}]
N-freies M 1 mit 0.1 mol l^{-1} Phosphatpuffer	5	5	1
N-freies M 1 mit 0.01 mol l^{-1} Phosphatpuffer	4.5	7	1.5
N+P-freies M 1 mit 0.1 mol l^{-1} Trispuffer	4.5	10	2
N+P-freies M 1 mit 0.01 mol l^{-1} Trispuffer	4.5	12	2.2

Ausgehend von den Versuchen im Schüttelkolbenmaßstab wurde eine Kultivierung von ruhenden Zellen in einem 2 l Bioreaktor durchgeführt. Hierbei konnte durch pH-Korrektur auf ein eventuell die Produktion negativ beeinflussendes Puffersystem verzichtet werden und die Kultivierung im Bereich des pH-Optimums durchgeführt werden.

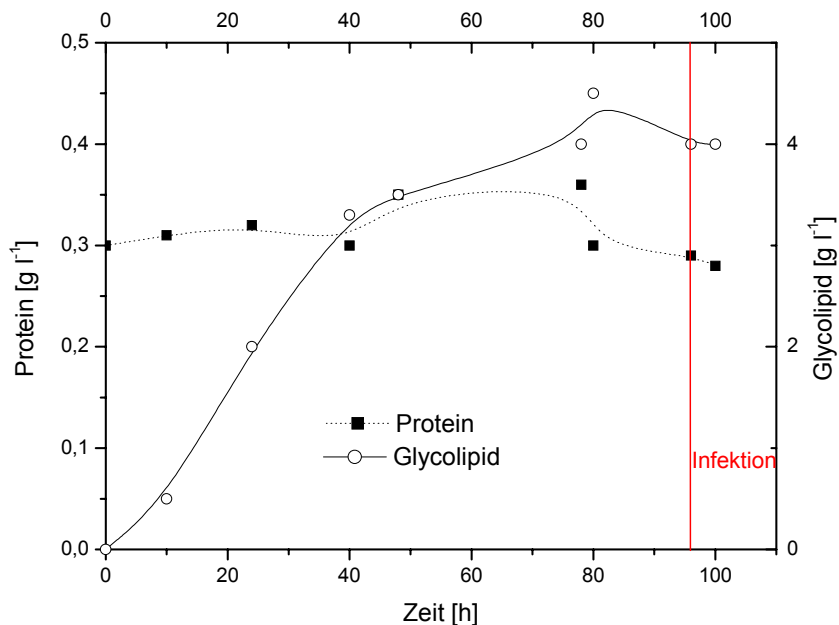


Abbildung 3.8: Kultivierung von ruhenden Zellen von *Tsukamurella spec.* im 2 l Bioreaktor. 8 g l⁻¹ BFM, 20 g l⁻¹ Sonnenblumenöl, N+P-freies M1-Standard-Medium. pH 7,5, T = 30°C, Begasung 1,9 NI min⁻¹, 300 Upm.

Dazu wurden die Zellen im Standard-Medium M 1 auf Sonnenblumenöl angezogen, abzentrifugiert, gewaschen und in ein P+N-freies M1 Medium ohne Puffer überführt. Abbildung 3.8 zeigt den Verlauf des Zellproteins und die Glycolipidbildung über die Kultivierungsdauer. Nach 96 h war mikroskopisch eine Infektion zu erkennen. Durch den Verzicht auf Puffersubstanzen, die pH-Korrektur und eine N+P-freie Kulturführung konnte die Glycolipidproduktion auf bis zu ca. 4 g l⁻¹ gesteigert werden. Bei einem Substratverbrauch von 16 g l⁻¹ ergab sich ein Ausbeutekoeffizient von $Y_{P/S} = 0,25$. Eine Infektion und damit eine weitere Steigerung der Produktausbeute könnte nur durch aseptische Arbeitsmethoden bei der Überführung der Biomasse in den Bioreaktor erreicht werden. Die war allerdings unter den gegebenen Bedingungen nicht gegeben.

Kultivierung mit immobilisierten Zellen

Die Vorversuche hatten gezeigt, dass eine Kultivierung mit ruhenden Zellen möglich war. Um zum einen eine Stabilitätssteigerung der Kultur zu erreichen und zum anderen eine leichtere Abtrennung der Biomasse bei der Aufarbeitung zu ermöglichen, wurde die Kultivierung mit immobilisierten Zellen wiederholt. Zwei Methoden zur Immobilisierung wurden angewendet. Zum einen der Aufwuchs auf Trägermaterialien, zum anderen der Einschluss in Ca-Alginat.

Als Trägermaterialien wurden Würfel aus Polyurethanschaum mit einer Kantenlänge von 0.5 cm und kugelförmige Silicon-Träger von der Arbeitsgruppe Vorlop (Institut für Technologie und Biosystemtechnik der FAL-Braunschweig) mit einem mittleren Durchmesser von 1.8 - 2.0 mm und einer Porosität von 70% eingesetzt. Die Aufwuchsversuche erfolgten in Schüttelkolben mit M1-Standard-Medium. Die trägerfixierte Biomasse wurde wie in Abschnitt 2.4.6 beschrieben ermittelt. *Tsukamurella spec.* zeigte jedoch in beiden Fällen nur ein relativ schlechtes Aufwuchsverhalten. So konnte bei den Polyurethankörpern nur eine immobilisierte Biomasse von 5 g pro kg Trägermaterial ermittelt werden und bei den Silicon-Trägern war sie noch geringer. Damit wurde die Trägerfixierung als mögliches Immobilisierungsverfahren verworfen.

Für die Ca-Alginat-Fixierung wurden die Zellen ebenfalls auf dem M1-Standard-Medium angezogen, abzentrifugiert und gewaschen. Die Alginatperlenherstellung erfolgte wie unter Abschnitt 2.3.7 beschrieben.

In einer 2 l-Bioreaktorkultivierung kam ein M1-Medium ohne N+P-Quelle und 14 g Immobilisat (entspricht 2 g l^{-1} BFM) unter Zusatz von 1 % (w/v) CaCl_2 (zur Stabilisierung des Immobilisats) zum Einsatz (Bedingungen: 20 gl^{-1} Sonnenblumenöl, pH 7.5, $T = 30^\circ\text{C}$, Begasung: 1.9 NI min^{-1} , 300 Upm). Auf Grund der fehlenden Puffersubstanzen, der Konstanz des pH-Wertes und der guten Durchmischung der Suspension im Reaktor konnte eine höhere Glycolipidproduktion beobachtet werden. Bei einer erreichten Konzentration von 1.1 gl^{-1} Glycolipid und einem Substratverbrauch von 5.8 g l^{-1} Sonnenblumenöl ergibt sich ein $Y_{P/S} = 0.19$ und ein $Y_{P/X} = 0.55$ (bezogen auf die BFM).

Während der gesamten Versuchzeit (275h) blieben die Immobilisate stabil. Allerdings war nach etwa 175h eine Infektion im Reaktor zu beobachten, welche die

Glycolipidproduktion zum Erliegen brachte. Bis zum Auftreten der Infektion waren nur geringe Mengen freier Zellen mikroskopisch nachweisbar.

Wie bei der Bioreaktorkultivierung mit den freien ruhenden Zellen ist die Infektion auf die ungenügenden aseptischen Arbeitsmethoden bei der Ernte der Zellen und der Herstellung der Immobilisate zurückzuführen.

3.3.3 Limitierungsversuche

Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass gerade der N-Limitierung bei der Glycolipid-überproduktion durch *Tsukamurella* spec. eine große Bedeutung zukommt. Auf den negativen Einfluss von Phosphat auf die Produktion wurde bereits ebenfalls mehrfach hingewiesen. Hier sollen die Limitierungsfaktoren durch Bioreaktorfermentationen genauer untersucht und geeignete Limitierungsbedingungen für eine Erhöhung der Glycolipidproduktion beschrieben werden.

3.3.3.1 Phosphatlimitierung

Bei diesem Versuch sollte gezeigt werden, welchen Einfluss eine alleinige Phosphatlimitierung auf das Wachstum und die Glycolipidproduktion ausübt. Dazu wurde das Inokulum auf Tris-Puffer angezogen, in einem 10 l Bioreaktor eine definierte Phosphatmenge vorgelegt und eine Stickstoffversorgung durch eine kontinuierliche Ammonium-Zudosage gewährleistet. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 3.4 dargestellt (auf eine detaillierte Darstellung des Kultivierungsverlaufs wurde verzichtet).

Tabelle 3.4: Bedingungen für die phosphatlimitierte Fedbatch-Kultivierung im 10 l Bioreaktor.

Kultivierungsbedingungen		Kultivierungsbedingungen	
Volumen	10 l Kulturvolumen	Begasung	0.4 v/vm
Drehzahl	900 Upm	Medium	M 1 ohne Phosphatpuffer
Rührertyp	Rushton Turbinen		0.44 g l ⁻¹ K ₂ HPO ₄
Temperatur	30 °C		1.14 g l ⁻¹ (NH ₄)SO ₄ [*]
pH	geregelt auf 7.5		20+30 g l ⁻¹ SB-Öl

^{*} Anfangskonzentration

Nach 18 h war die Phosphatkonzentration gegen Null gesunken. Sowohl an der danach stabilen Konzentration des Zellproteins und am relativ konstantem Verlauf des pO_2 war zu erkennen, dass die Wachstumsphase damit beendet und die Zellen in die stationäre Phase übergegangen waren.

Die anfängliche Ammoniumkonzentration fiel während der Wachstumsphase ebenfalls fast gegen Null; der Verbrauch wurde dann jedoch durch die kontinuierliche Zudosage kompensiert (Zudosage nach 10 h Kultivierung): anfänglich mit einer Rate von $1.5 \text{ mmol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (ausgehend von einer in Vorversuchen ermittelten Ammoniumverbrauchsrate von $1,5 \text{ mmol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ der Zellen in der exponentiellen Phase) und nach 22 h mit einer Rate von $0.74 \text{ mmol l}^{-1}\text{h}^{-1}$. Durch den gemessenen Anstieg der Amminiumkonzentration war zu erkennen, dass das Ammonium im Medium akkumuliert wurde, die Verbrauchsrate also niedriger lag als die Zudosierungsrate. Allerdings war ein Verbrauch an Ammonium auch während der stationären Phase zu beobachten, vor allem als die Zudosierung nach 42 h ausgesetzt wurde.

Die Kultivierung war als Fedbatch ausgelegt. 20 g l^{-1} Sonnenblumenöl wurden vorgelegt und sowohl wenn mikroskopisch nur noch wenige Öltröpfchen zu beobachten waren als auch wenn die Kultur überschäumen drohte wurde Öl in 5 g l^{-1} Schritten zudosiert (das Öl diente hier als Antischaummittel). Aus 25 g l^{-1} Sonnenblumenöl wurden nur etwa 0.7 g l^{-1} Glycolipid gebildet ($Y_{P/S} = 0.028$). GL 1 wurde auch, wie schon in vorangegangenen Kultivierungen, wachstumsgekoppelt gebildet; GL 2 und GL 3 dagegen erst mit dem Beginn der stationären Phase. Am Ende der Kultivierung (120h) lagen alle drei Glycolipide in nahezu gleicher Konzentration vor. Der Versuch zeigte, dass eine alleinige Phosphatlimitierung zur Erreichung der stationären Phase nicht zur Indizierung der Überproduktion der Glycolipide ausreichte.

3.3.3.2 P- und N-Limitierung durch sukzessive Phosphatzugabe

Eine alleinige Phosphatlimitierung hatte zu keiner Überproduktion der Glycolipide geführt (Abschnitt 3.3.3.1). Deshalb sollte hier die Kombination von Phosphat- und Stickstofflimitierung durch eine sukzessive Phosphatzugabe erreicht werden. Dazu wurden die Zellen erst auf einem Grundmedium (20 g l^{-1} Sonnenblumenöl und

diskontinuierliche Nachdosage an Öl) mit 3.3 g l^{-1} Ammoniumsulfat und 0.12 g l^{-1} K_2HPO_4 (Tabelle 3.5) so lange kultiviert, bis durch Einsetzen einer Phosphatlimitierung die stationäre Phase erreicht wurde. Anschließend erfolgte eine zweimalige Nachdosierung von Phosphat (0.15 g l^{-1}), so dass nach einer weiteren Wachstumsphase auch die Stickstoffkonzentration auf Null zurückging (s. Abbildung 3.9).

Anzumerken ist hier, dass bei allen durchgeführten Kultivierungen die gemessenen Phosphat- und Stickstoffkonzentrationen nicht die tatsächlich im Bioreaktor vorhandenen Konzentrationen wiedergeben. Dies lässt sich auf die störenden Einflüsse von Substrat und Zellbruchstücken auf die Messung zurückführen. Wichtig bei der Darstellung des Konzentrationsverlaufes ist hierbei aber auch nicht der absolute Wert, sondern ob sich überhaupt noch Phosphat oder Stickstoff im System befindet. Dazu war das benutzte System in der Lage.

Die nachgeschaltete Wachstumsphase zeigte keinen exponentiellen Verlauf, wie an der langsamen Abnahme der Stickstoffkonzentration und des langsamen Anstiegs der Biomassekonzentration zu erkennen ist. Dadurch verblieb die Kultur etwa 120 h in der Wachstumsphase. Kurz vor Erreichen der Doppellimitierung (80 h) kam es zu einem starken Aufschäumen der Kultursuspension, so dass eine größere Menge an Öl zudosiert werden musste.

Tabelle 3.5: Bedingungen für die phosphatlimitierte Fedbatch-Kultivierung im 50 l Bioreaktor.

Kultivierungsbedingungen		Kultivierungsbedingungen	
Volumen	20 l Kulturvolumen	Begasung	0.4 v/vm
Drehzahl	550 Upm	Medium	M 1 ohne Phosphatpuffer
Rührertyp	Rushton Turbinen		$0.12 + 0.3 \text{ g l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$
Temperatur	30 °C		$3.3 \text{ g l}^{-1} (\text{NH}_4)\text{SO}_4$
pH	geregelt auf 7.5		$20 + (42^*) \text{ g l}^{-1} \text{ SB-Öl}$

* Nachdosage

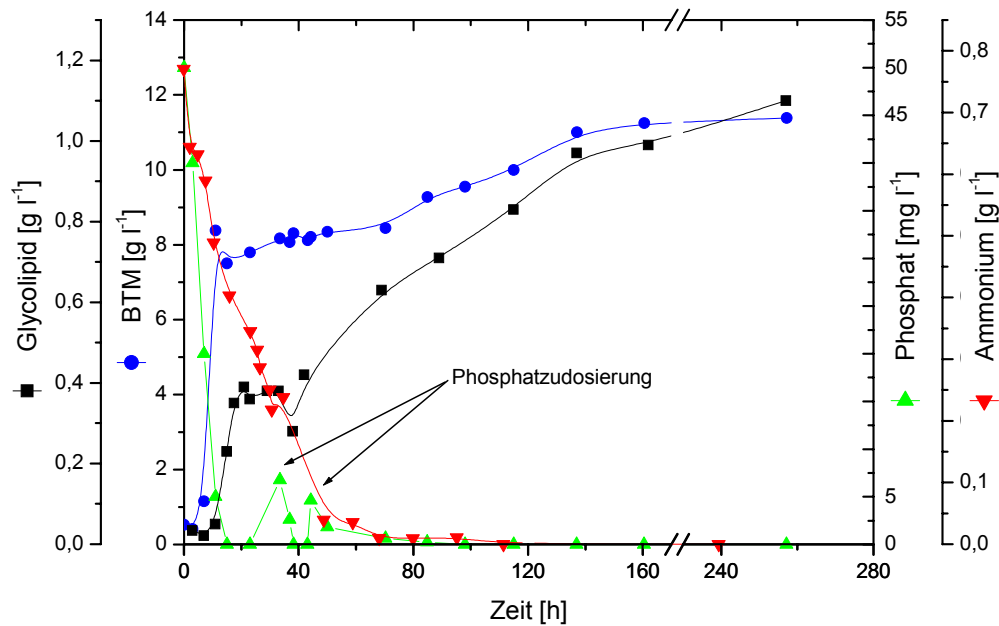


Abbildung 3.9: Kultivierungsparameter während der durch sukzessive Phosphatzugabe erreichten P- und N- limitierten Produktion, 50l Bioreaktor, 20l Kulturvolumen, 0.4 v/vm, 550 Upm., M1

Durch die zweistufige Kultivierung von *Tsukamurella spec.* verschob sich die Zusammensetzung des Produktes (Abbildung 3.10). In der ersten Wachstumsphase wurde nur GL 1 gebildet und ins Medium ausgeschieden. Danach erfolgte in der zweiten Wachstumsphase auch die Produktion von GL 2 und erst nach dem Erreichen der Doppellimitierung konnte GL 3 nachgewiesen werden. Die geringe Ausbeute ist wahrscheinlich auf die wesentlich verlängerte zweite Wachstumsphase zurückzuführen, da die zur Überproduktion benötigte Stickstofflimitierung erst sehr spät einsetzte.

Tabelle 3.6: Produktbildungsparameter der Kultivierung mit sukzessiver Phosphatzudosierung.

Parameter		Parameter	
Produktausbeute	1.1 g l ⁻¹	P _V	0.0042 g l ⁻¹ h ⁻¹
Biomasse (BTM)	11 g l ⁻¹	Y _{P/X}	0.1
Substratverbrauch	30 g l ⁻¹	Y _{P/S}	0.036

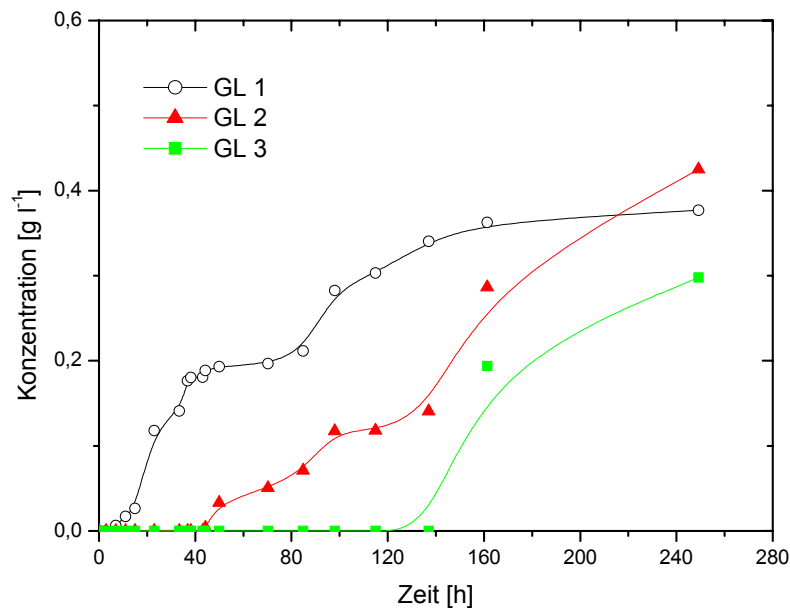


Abbildung 3.10: Zusammensetzung des Glycolipidgemisches im Verlauf der Kultivierung (Abbildung 3.9).

3.3.3.3 P- und N-Limitierung durch sukzessive Stickstoffzugabe

Die Darstellung einer Stickstoff- und Phosphatlimitierung durch sukzessive Zugabe von Phosphat führte zu einer verlängerten Wachstumsphase und damit zu einer geringen Ausbeute an Glycolipiden (Kapitel 3.3.3.2). Hier sollte die Doppellimitierung nun durch die sukzessive Zugabe von Stickstoff realisiert werden.

Dazu wurden die Zellen auf einem Grundmedium (s. Tabelle 3.7) bis zur Stickstofflimitierung (nach ca. 25h) kultiviert und anschließend noch einmal 1.24 g l^{-1} Ammoniumsulfat zudosiert. Nach 55 h konnte so eine N- und P-Limitierung erreicht werden (Abbildung 3.11).

20 g l^{-1} Sonnenblumenöl wurden vorgelegt und diskontinuierlich bei Bedarf zugegeben, wenn unter dem Mikroskop nur noch wenig Öltröpfchen im Medium zu erkennen waren. Nach Erreichen der Doppellimitierung war wiederum ein starkes Aufschäumen der Kultursuspension zu beobachten, wobei ein Überschäumen durch weitere Ölzugabe verhindert werden konnte.

Tabelle 3.7: Bedingungen für die N- und P-limitierte Fedbatch-Kultivierung durch sukzessive Ammoniumzugabe im 10 l Bioreaktor.

Kultivierungsbedingungen		Kultivierungsbedingungen	
Volumen	10 l Kulturvolumen	Begasung	0.4 v/vm
Drehzahl	900 Upm	Medium	M 1 ohne Phosphatpuffer
Rührertyp	Rushton Turbinen		0.44 g l ⁻¹ K ₂ HPO ₄
Temperatur	30 °C		1.24 + 1.24 g l ⁻¹ (NH ₄)SO ₄
pH	geregelt auf 7.5		20+58 g l ⁻¹ SB-Öl

Wie am Verlauf der Biomassekonzentration und der Abnahme der Stickstoffkonzentration zu erkennen ist, war kein Übergang zwischen den beiden Wachstumsphasen zu beobachten. Die Verbrauchsraten und die Wachstumsgeschwindigkeit blieben nahezu konstant. Die maximale Produktkonzentration wurde nach etwa 90h erreicht. Im weiteren Verlauf der Kultivierung ist nach Erreichen eines Maximalwertes ein Absinken der Glycolipidkonzentration zu beobachten. Ursache dafür könnte eine nicht repräsentative Probeentnahme (durch das Aufflottieren der Biomasse) oder ein Abbau der Glycolipide durch *Tsukamurella spec.* sein. Da dieser Effekt auch bei weiteren Kultivierungen auftrat, wird er gesondert in Abschnitt 3.3.4.3 untersucht.

Diese Kultivierung zeigt, dass bei der Doppellimitierung eine wesentlich höhere Produktausbeute zu erzielen ist. Begünstigt durch eine fast kontinuierliche Wachstumsphase, durch die Eliminierung des negativen Phosphateinflusses, durch eine gute Substratversorgung und pH-Regelung konnte eine Glycolipidkonzentration von 10.5 g l⁻¹ erzielt werden.

Der respiratorische Koeffizient (RQ) stieg in der exponentiellen Phase an und behielt im Mittel über die gesamte Kultivierung einen Wert von 0.8. Damit lag er nur unwesentlich höher als der theoretische Wert für Fette mit ungefähr 0.7. In Tabelle 3.8 sind noch einmal die wichtigsten Parameter dargestellt, die am Ende der Kultivierung erzielt wurden.

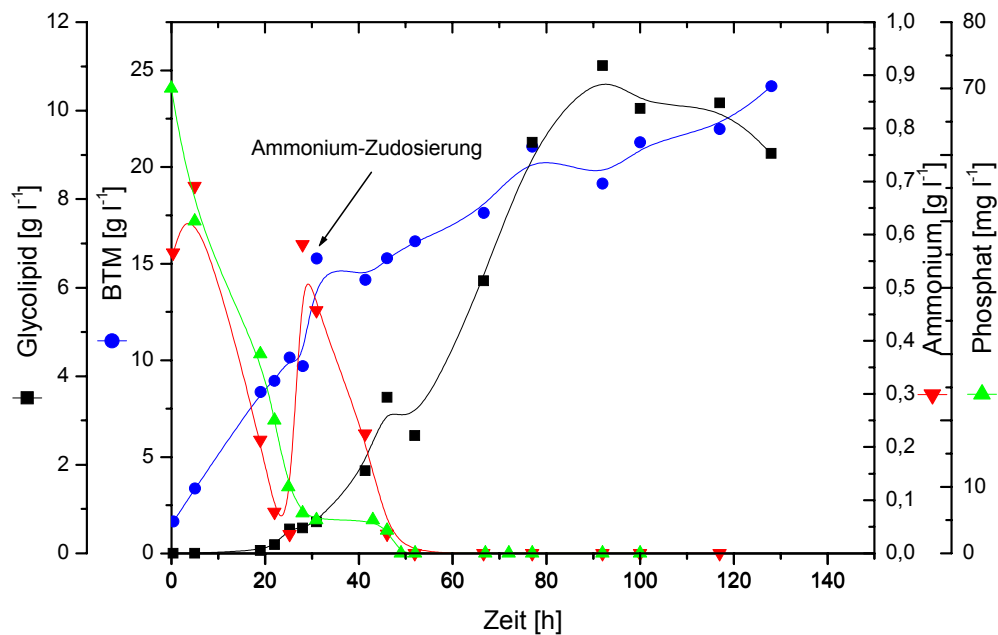


Abbildung 3.11: Kultivierungsparameter während der P- und N- limitierten Produktion durch sukzessive Stickstoffzugabe.

Tabelle 3.8: Produktbildungsparameter der Kultivierung mit sukzessiver Stickstoffzudosierung.

Parameter		Parameter	
Produktausbeute	10.5 g l ⁻¹	P _V	0.12 g l ⁻¹ h ⁻¹
Biomasse (BTM)	22.5 g l ⁻¹	Y _{P/X}	0.47
Substratverbrauch	43 g l ⁻¹	Y _{P/S}	0.24

Abbildung 3.12 stellt die Produktzusammensetzung im zeitlichen Verlauf der Kultivierung dar. Auch hier ist zu erkennen, dass GL 1 schon während der gesamten Wachstumsphase gebildet wurde. GL 2 wurde nach der ersten Stickstofflimitierung zum ersten Mal detektiert und nimmt auch nach der N-Zudosage weiter zu. GL 3 wird dagegen erst nach der exponentiellen Wachstumsphase mit Erreichen der P- und N-Limitierung gebildet. Die Konzentration an GL 1 bleibt in der stationären Phase nahezu konstant, während GL 3 und GL 2 ihre maximale Konzentration erreichen und GL 2 anschließend wieder abnimmt.

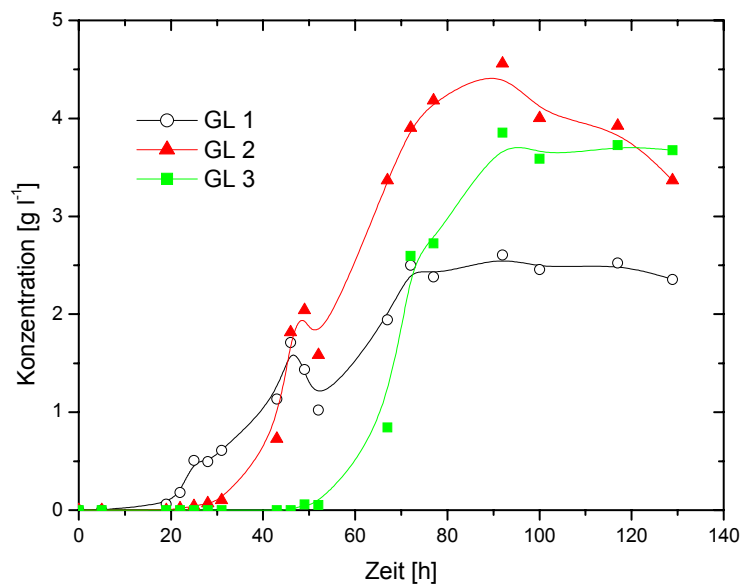


Abbildung 3.12: Zusammensetzung des Glycolipidgemisches im Verlauf der Kultivierung (Abbildung 3.11).

3.3.3.4 Gleichzeitige Phosphat- und Stickstofflimitierung

Die guten Ergebnisse der Kultivierung unter N- und P-limitierten Bedingungen durch sukzessive Stickstoffzugabe führten zu der Überlegung, dass die eventuell vorhandenen negativen Einflüsse einer mehrstufig geführten Wachstumsphase durch eine gleichzeitige Limitierung von Stickstoff und Phosphat, d.h. durch nur eine Wachstumsphase, vermieden werden könnten.

Tabelle 3.9: Bedingungen für die P- und N- limitierte Fedbatch-Kultivierung im 50 l Bioreaktor.

Kultivierungsbedingungen		Kultivierungsbedingungen	
Volumen	20 l Kulturvolumen	Begasung	0.4 v/vm
Drehzahl	550 Upm	Medium	M 1 ohne Phosphatpuffer
Rührertyp	Rushton Turbinen		0.44 g l ⁻¹ K ₂ HPO ₄
Temperatur	30 °C		3.72 g l ⁻¹ (NH ₄)SO ₄
pH	geregelt auf 7.5		20+70 g l ⁻¹ SB-Öl

Dazu wurden die Zellen unter den in Tabelle 3.9 dargestellten Bedingungen kultiviert. Die Phosphat- und Stickstoffzugaben erfolgten als Batch. Nach 30h begann die stationäre Wachstumsphase und es konnte kein Phosphat und Ammonium im Medium mehr nachgewiesen werden. Substrat wurde während der Kultivierung entweder portionsweise nachdosiert oder aber bei drohender Überschäumung semi-kontinuierlich zugefüttert.

Die Glycolipidmenge erreichte während der exponentiellen Phase einen Wert von 1.5 g l^{-1} , um dann nach der Limitierung auf 14 g l^{-1} anzusteigen. Die Biomasse blieb in der stationären Phase nahezu konstant bei 18 g l^{-1} (s. Abbildung 3.13).

Der respiratorische Koeffizient stieg während der exponentiellen Phase auf 0.6 und behielt diesen Wert auch während der weiteren Kultivierungsdauer im Mittel bei. Damit liegt er etwas unterhalb des theoretischen Wertes für Fette.

Unter den gewählten Kultivierungsbedingungen wurden alle drei Glycolipide über den Kultivierungsverlauf in nahezu gleich großen Anteilen gebildet (Abbildung 3.14). Wiederum setzte die Synthese von GL 1 bereits in der exponentiellen Phase ein, während GL 2 und GL 3 erst mit Beginn der stationären Phase gebildet wurden.

In Tabelle 3.10 sind noch einmal die wichtigsten Parameter dargestellt, die am Ende der Kultivierung erzielt wurden.

Tabelle 3.10: Produktbildungsparameter der Kultivierung bei gleichzeitiger P- und N-Limitierung.

Parameter		Parameter	
Produktausbeute	14.0 g l^{-1}	P_V	$0.15 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$
Biomasse (BTM)	18.0 g l^{-1}	$Y_{P/X}$	0.77
Substratverbrauch	50 g l^{-1}	$Y_{P/S}$	0.28

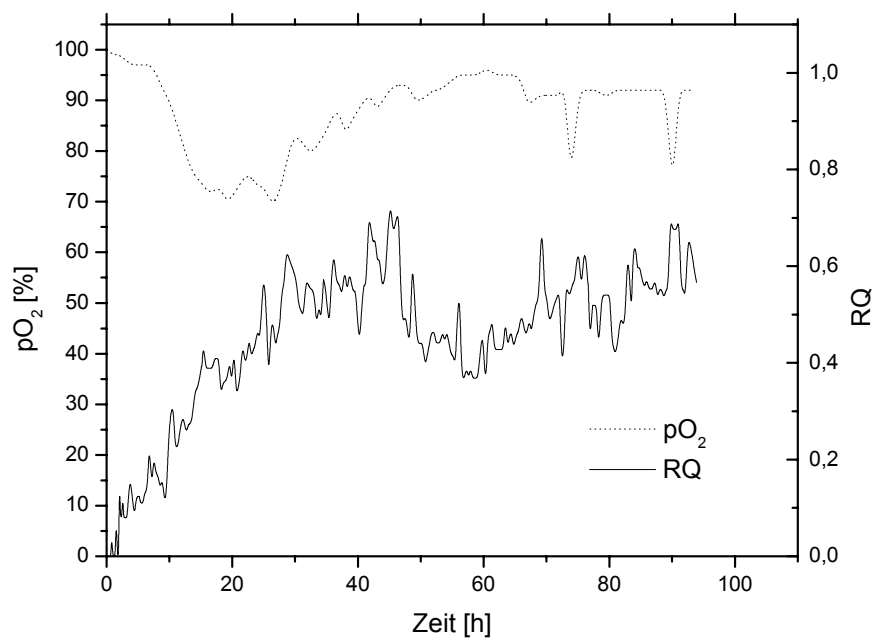
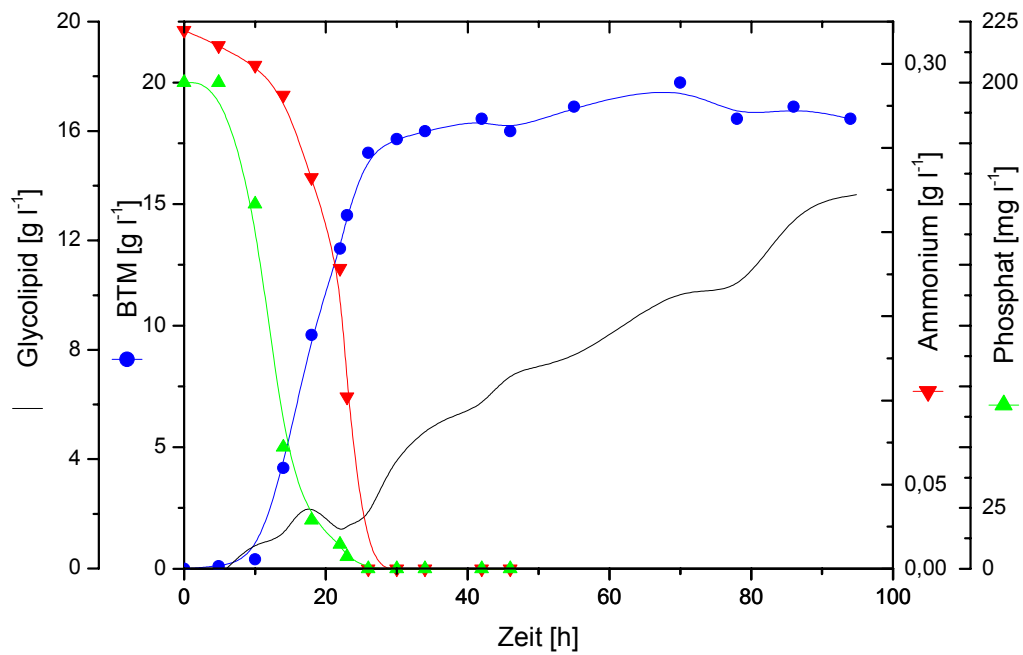


Abbildung 3.13: Kultivierungsparameter während der zeitgleichen P- und N- Limitierung.

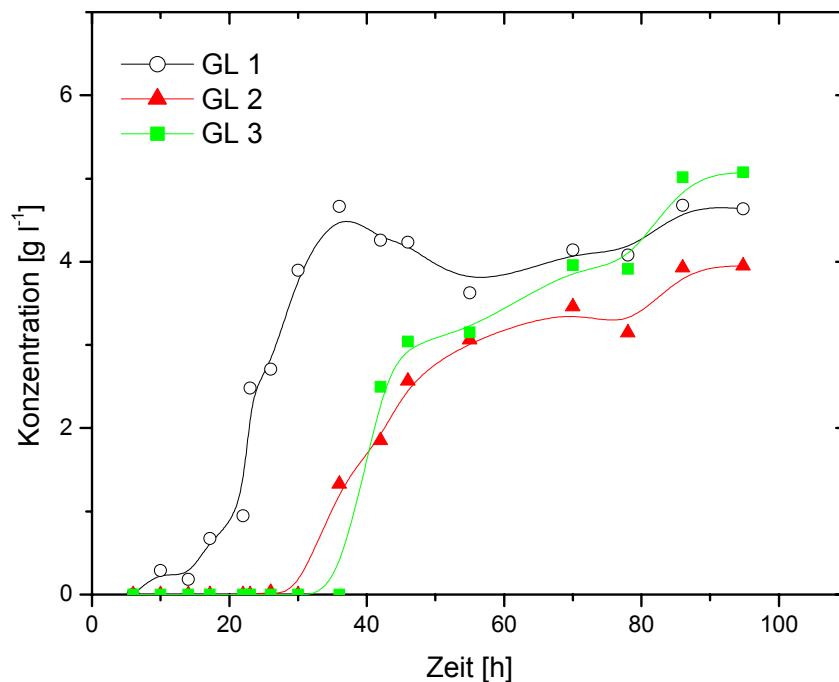


Abbildung 3.14: Zusammensetzung des Glycolipidgemisches im Verlauf der Kultivierung (Abbildung 3.13).

3.3.3.5 Sauerstofflimitierung

Neben einer Katabolitrepression, die die Bildung von sekundären Metaboliten einleitet und aufrechterhält, kennt die Literatur auch noch andere Limitierungen, die zur gewünschten Produktakkumulation führen. Ein Beispiel ist die Sauerstofftransportlimitierung [LEHMANN, J., 1978; LAFFERTY, R. M., 1981].

Hier sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss eine Sauerstofftransportlimitierung neben der Stickstoff- und Phosphatlimitierung auf die Produktbildung hat. Dazu wurden die Zellen auf M1 – Standardmedium mit einer definierten Menge an Ammoniumsulfat, K_2HPO_4 und Substrat (Tabelle 3.11) bis zum Erreichen der stationären Phase unter Gelöstsauerstoffbedingungen zwischen 100% und 70% kultiviert (auf eine detaillierte Darstellung der Kultivierungsparameter wurde verzichtet). Nach 30h (nach Ende der exponentiellen Phase) wurde dann auf sauerstofflimitierende Bedingungen mittels der Drehzahlregelung (200-300 Upm) und

der Belüftungsregelung ($< 0.17 \text{ v/vm}$) umgestellt. Die Gelöstsauerstoffkonzentration lag durch die Regelung bei etwa 5 %.

Die Glycolipidkonzentration stieg nach dem Erreichen der P- und N-Limitierung auf 2.5 g l^{-1} an, stagnierte aber nach etwa 40h, als der pO_2 auf die gewünschten 5 % gesunken war. Der respiratorische Koeffizient bewegte sich während des gesamten Kultivierungsverlaufs um 0.7; selbst nach dem Erreichen der Sauerstofflimitierung.

Ein Absterben der Zellen konnte in dem untersuchten Zeitraum nicht beobachtet werden, so dass die gewählte Versorgung mit Sauerstoff für den Erhaltungsstoffwechsel ausreichte. Glycolipide wurden aber nicht mehr produziert, so dass eine weitere Steigerung der Produktivität gegenüber der einfachen Doppellimitierung unter den gewählten Bedingungen nicht zu erreichen war.

Für die Überproduktion der Glycolipide in der stationären Phase scheinen damit folgende Limitierungsbedingungen geeignet zu sein: Eine gleichzeitige Stickstoff- und Phosphatlimitierung und die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff.

Tabelle 3.11: Bedingungen für die sauerstofflimitierte Kultivierung im 10l Bioreaktor.

Kultivierungsbedingungen		Kultivierungsbedingungen	
Volumen	10 l Kulturvolumen	Begasung	0.4^* ; $< 0.17 \text{ v/vm}$
Drehzahl	900^* ; 200-300 Upm	Medium	M 1 ohne Phosphatpuffer
Rührertyp	Rushton Turbinen		$0.44 \text{ gl}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$
Temperatur	$30 \text{ }^\circ\text{C}$		$3.72 \text{ gl}^{-1} (\text{NH}_4)\text{SO}_4$
pH	geregelt auf 7.5		$20 \text{ gl}^{-1} \text{ SB-Öl}$

* Anfangsbedingungen

3.3.4 Hemmende Einflüsse auf Wachstum und Produktbildung

Die bisher aufgeführten Bioreaktorkultivierungen hatten gezeigt, dass unter geeigneten Kultivierungsbedingungen eine Überproduktion der Glycolipide möglich ist. Eine Steigerung der Glycolipidkonzentration über die gefundenen 14 g l^{-1} (vgl. Abschnitt 3.3.3.4) hinaus war allerdings nicht zu erreichen. Hier sollte nun untersucht werden, ob diese Konzentrationsgrenze auf eine Substrat- oder Produkthemmung zurückgeführt werden kann.

3.3.4.1 Einfluss der Substratkonzentration

In der Regel wurde für die Kultivierung eine Anfangssubstratkonzentration von 20 g l^{-1} gewählt. Ein hydrophobes, nicht wasserlösliches Substrat, wie Pflanzenöl, stellt ein gewisses Problem bei der Kulturführung dar. Zu Beginn der Wachstumsphase, wenn noch kein oder nur wenig Glycolipid frei in der Kultursuspension vorhanden ist, kann es noch zu keiner Emulsionsbildung zwischen Medium und Substrat kommen, wodurch die Nahrungsaufnahme der Zellen erschwert ist. So ist eine höhere Substratkonzentration zu diesem Zeitpunkt zu begrüßen. Auch die Verwendung des Öls als Antischaummittel, bereits zu Beginn der stationären Phase, bei der es sonst zu einem Verlust von Biomasse kommen würde, rechtfertigt eine höhere Substratkonzentration schon zu diesem Zeitpunkt und nicht eine erst situationsbedingte Nachdosierung. Andererseits sei hier auf den negativen Effekt der Sauerstofflöslichkeit von Öl gegenüber Wasser hingewiesen. In Öl ist sie etwa um eine Zehnerpotenz höher als in Wasser [D'ANS LAX, 1967], so dass eine zu hohe Substratkonzentration einen verminderten Sauerstofftransport für die Zellen darstellt und dies zu einer verminderten Produktivität führen könnte.

Um den Einfluss der Substratkonzentration auf Zellwachstum und Glycolipidproduktion zu untersuchen, wurden Schüttelkolbenkultivierungen auf phosphatpufferfreiem Standardmedium mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt. Eventuell auftretende pH-Wertänderungen wurden manuell bei jeder Probenentnahme korrigiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.12 dargestellt. Es zeigte sich, dass bei Versuch S 2 mit 20 g l^{-1} Substrat die größten Mengen an Protein und Glycolipid gebildet wurden. Mit weniger Substrat konnte dementsprechend eine geringere Produktivität beobachtet werden und es dauerte länger, bis die Stickstofflimitierung einsetzte. Mehr Substrat bedeutete aber nicht, dass mehr Produkt gebildet wurde; im Gegenteil. Es blieb mehr Substrat ungenutzt und die Ausbeuten lagen unter dem Optimum von Versuch S 2. Dies zeigt, dass, zumindest im Schüttelkolbenmaßstab, bei dem eine optimale Sauerstoffversorgung und eine genügende Durchmischung nicht gewährleistet ist, die Substratkonzentration eine Konzentration von $20 - 30 \text{ g l}^{-1}$ nicht überschreiten sollte.

Tabelle 3.12: Einfluss der Substratkonzentration auf Biomassen- und Produktkonzentration.
 2 l Schüttelkolben, 0.1 mol Trispuffer, M1, 30 °C, 100 Upm, Sonnenblumenöl.

Versuch	Substrat- konzentration [g l ⁻¹]	Protein* [g l ⁻¹]	Glycolipid* [g l ⁻¹]	Zeit bis N-Limitierung [h]	Substrat- verbrauch* [%]
S 1	5	1.3	2.2	72	100
S 2	20	1.9	3.6	48	100
S 3	40	1.8	3.0	48	n.b.
S 4	60	1.2	2.7	48	n.b.
S 5	80	1.6	2.3	48	n.b.
S 6	100	1.9	2.0	48	30

* nach 100h

Weitergehend wurden Bioreaktorkultivierungen mit unterschiedlichen Substratanfangskonzentrationen untersucht (nicht dargestellt). Hierbei konnte jedoch keine signifikante Abhängigkeit zwischen Substratkonzentration und der Biomasse- bzw. Produktkonzentration festgestellt werden. Selbst die Erhöhung der Substratkonzentration auf 60 g l⁻¹ als Batch ergab keinen Unterschied zu einem Fed-batch mit einer Anfangskonzentration von 20 g l⁻¹, bei dem nach Verbrauch Substrat zudosiert wurde. Ein hemmender Einfluss einer hohen Substratkonzentration konnte also auf Grund der guten Durchmischung und besseren Sauerstoffversorgung im Bioreaktor ausgeschlossen werden. Als positiv erwies sich eine höhere Substratkonzentration beim Übergang in die stationäre Phase, also beim Erreichen der Stickstoff- und Phosphatlimitierung. Durch die erhöhte Ölkonzentration im Bioreaktor kam es nur zu geringem Aufschäumen der Kultursuspension und so zu keinem Verlust an Biomasse. Dieser positive Einfluss wird im Kapitel 3.3.5.4 noch näher untersucht.

3.3.4.2 Einfluss der Produktkonzentration

Hier sollte nun getestet werden, ob eine Produktinhibierung gegenüber *Tsukamurella* spec. vorliegt.

Zur Untersuchung kam dabei die Methode der Konzentrationserniedrigung der Glycolipide durch Verdünnung zum Einsatz. Dazu wurden die Zellen unter P- und N-limitierten Bedingungen in 12 l Standardmedium in einem 30 l Bioreaktor kultiviert. Nach Erreichen einer stagnierenden Produktkonzentration wurde die Kultursuspension mit 12 l sterilem Standardmedium ohne Phosphat- und Ammoniumzusatz verdünnt.

Bei einem ersten Versuch (nicht dargestellt) konnte dabei folgendes Phänomen beobachtet werden. Die direkt nach der Verdünnung gemessene Biomasse- und Glycolipidkonzentration entsprach nicht der erwarteten Hälfte der vor der Verdünnung ermittelten Konzentrationen. Eine repräsentative Probenentnahme nach Abbruch der Fermentation und gründlicher Durchmischung der Kultursuspension erbrachte, dass es vor der Verdünnung zu einer extremen Auflottierung der Biomasse gekommen sein musste. Die Probenentnahme am Boden des Bioreaktors ergab daher nur eine örtliche aber keine gesamte Konzentrationsangabe. Bei der Zugabe des Mediums durch den Deckel des Bioreaktors kam es dann wieder zu einer Homogenisierung der Kultursuspension und damit zu den abweichenden Konzentrationsergebnissen. Diese Beobachtung ließ auch den Schluss zu, dass entgegen den Untersuchungen von Vollbrecht [Vollbrecht, E., 1999] nicht die gesamte Glycolipidmenge durch die eingesetzte EDTA-Menge im Standardmedium in Lösung vorliegt sondern zum Teil auch noch zellgebunden ist. Weitere Untersuchungen in Bezug auf die EDTA-Konzentration werden in Kapitel 3.3.5.1 dargestellt.

Auf Grund dieser Beobachtungen wurde ein weiterer Verdünnungsversuch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Biomassenverteilung im Reaktor (durch eine doppelte Probenentnahme; am Boden und am Kopf der Flüssigkeitssäule) durchgeführt (Abbildung 3.15). Nach etwa 50 h war die exponentielle Wachstumsphase beendet, es wurde kein Phosphat und kein Ammonium mehr im

Medium nachgewiesen und die Biomasse erreichte ein Maximum von etwa 20 g l^{-1} . Die Konzentrationsangaben der Biomasse und des Glycolipids ergaben sich aus dem Mittelwert der beiden an verschiedenen Stelle des Reaktors gezogenen Proben (oben = obere Flüssigkeitshälfte; unten = untere Flüssigkeitshälfte). In der stationären Phase stieg die Glycolipidkonzentration auf 9.8 g l^{-1} und stagnierte nach etwa 100 h. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Zugabe von 12 l P- und N- freiem Medium. Nach der Verdünnung konnte eine erwartete Biomassekonzentration von im Mittel 10 g l^{-1} und eine Glycolipidkonzentration von 4.2 g l^{-1} gemessen werden. Im weiteren Verlauf der Kultivierung kam es nun nicht wie bei den vorherigen Untersuchungen nach dem Erreichen des Produktmaximums zu einer Verringerung der Glycolipidkonzentration, sondern es wurden weiterhin Glycolipide produziert. Nach 175 h war ein zweites Produktmaximum von 7.8 g l^{-1} erreicht. Bezogen auf die halbe Biomassekonzentration entspricht dies einer gleich hohen Produktivität wie der vor der Verdünnung. Berücksichtigt man nun noch, dass sich nicht das gesamte Glycolipid in Lösung befindet, sondern ein Teil auch noch zellwandgebunden vorliegt, dann ist die geringere Endkonzentration gegenüber dem ersten Produktmaximum (Unterschied etwa 2 g l^{-1}) ebenfalls auf die halbierte Biomassekonzentration zurückzuführen. Bezogen auf das anfängliche Kulturvolumen wurde somit eine Gesamtglycolipidmenge von 187 g oder eine Konzentration von 15.6 g l^{-1} produziert.

Als Ergebnis kann festgehalten werden: Es kommt unter den gewählten Kultivierungsbedingungen und der jeweils erreichten Biomassekonzentration zu einer bestimmten maximalen Glycolipidkonzentration. Eine Verringerung dieser Konzentration bei laufender Kultivierung ermöglicht eine erneute Produktion bis zu einem neuen Produktmaximum bezogen auf die vorhandene Biomassekonzentration. Damit zeigte sich eine Abhängigkeit der erzielbaren Produktkonzentration von der vorhandenen Biomasse und eine Produktionshemmung bei einer bestimmten Glycolipidkonzentration.

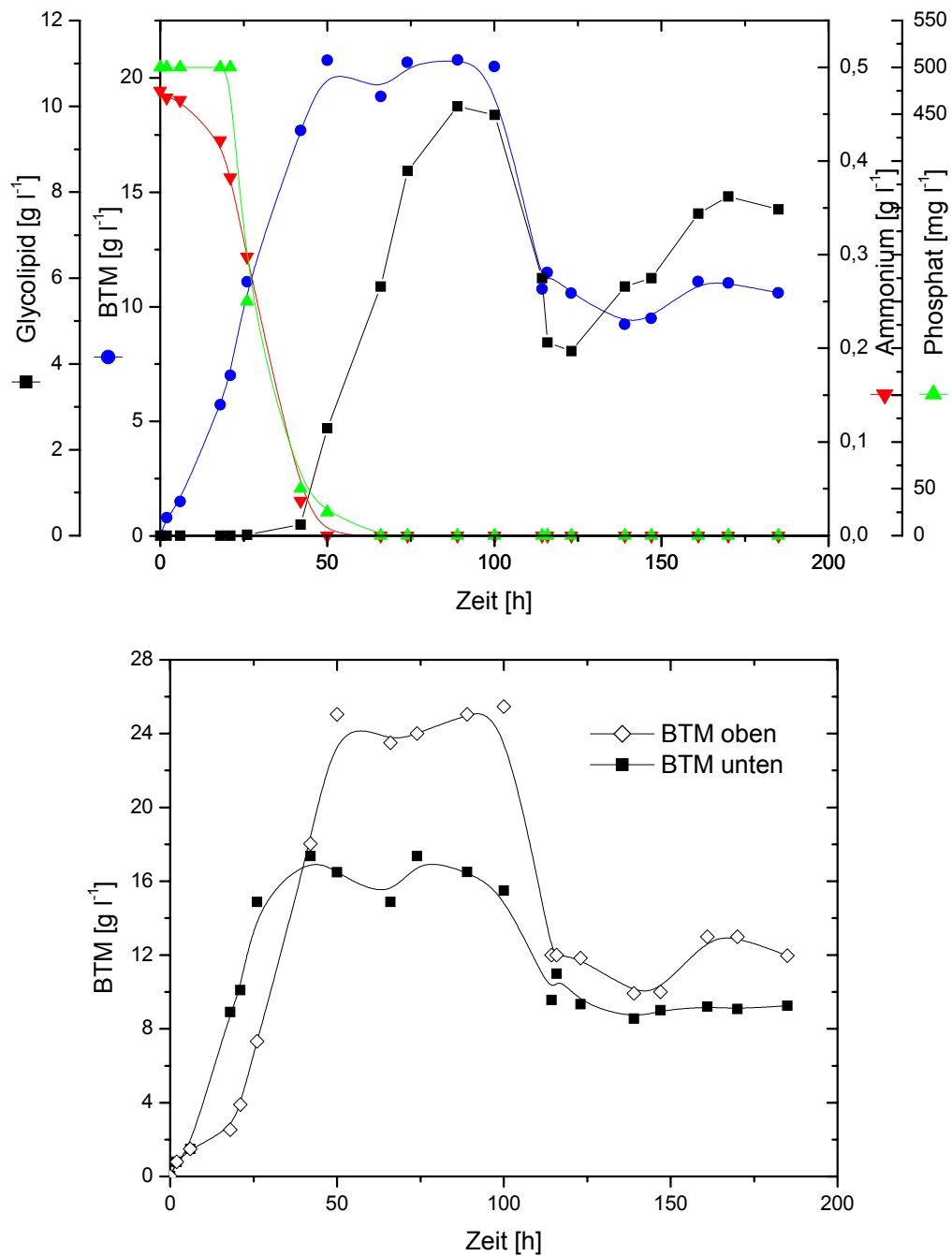


Abbildung 3.15: Kultivierungsparameter bei der Untersuchung des Einflusses der Produktkonzentration auf die Produktbildung. Zugabe von 12l M1 Medium nach 100 h. 30 l-Bioreaktor, 12 + 12l M1 Medium, 0.4 v/vm, 550 Upm, 30 °C, pH 7.5.

3.3.4.3 Untersuchungen zur Verwertung zelleigener Glycolipide

Da bei verschiedenen Kultivierungen nach dem Erreichen des Produktmaximums eine Verringerung der Glycolipidkonzentration beobachtet worden war, sollte im folgenden die Fähigkeit von *Tsukamurella spec.* untersucht werden, eigene Glycolipide bei verschiedenen Konzentrationen abzubauen.

Fünf Schüttelkolbenansätze mit verschiedenen Substratkombinationen wurden dazu untersucht. Der Start der Kultivierung erfolgte durch Zugabe von 10% Inokulum.

Zu dem Standardansatz mit Trispuffer und einer definierten Phosphat- und Ammoniumkonzentration kamen folgende Substratzugaben:

- 1) 20 g l⁻¹ Sonnenblumenöl (Vergleich)
- 2) 5 g l⁻¹ Glycolipidgemisch
- 3) 15 g l⁻¹ Glycolipidgemisch
- 4) 5 g l⁻¹ Glycolipidgemisch + 20 g l⁻¹ Sonnenblumenöl
- 5) 15 g l⁻¹ Glycolipidgemisch + 20 g l⁻¹ Sonnenblumenöl.

Der Verlauf der Glycolipid- und Proteinkonzentration ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Bei der Zugabe von zelleigenen Glycolipiden als alleinige Kohlenstoffquelle konnte kein Wachstum und auch kein Abbau beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war bei einer Konzentration von 5 g l⁻¹ Glycolipid in Verbindung mit Sonnenblumenöl während der Wachstumsphase eine Verringerung der Glycolipidkonzentration zu beobachten. Nach Erreichen der stationären Phase stieg die Konzentration der Produkte aber wieder an. Dagegen war bei einer Konzentration von 15 g l⁻¹ Glycolipid mit Sonnenblumenöl wohl eine Konzentration erreicht, die zu einer Wachstumshemmung führte. Aus diesem Grund war auch keine eindeutige Steigerung der Produktkonzentration erkennbar.

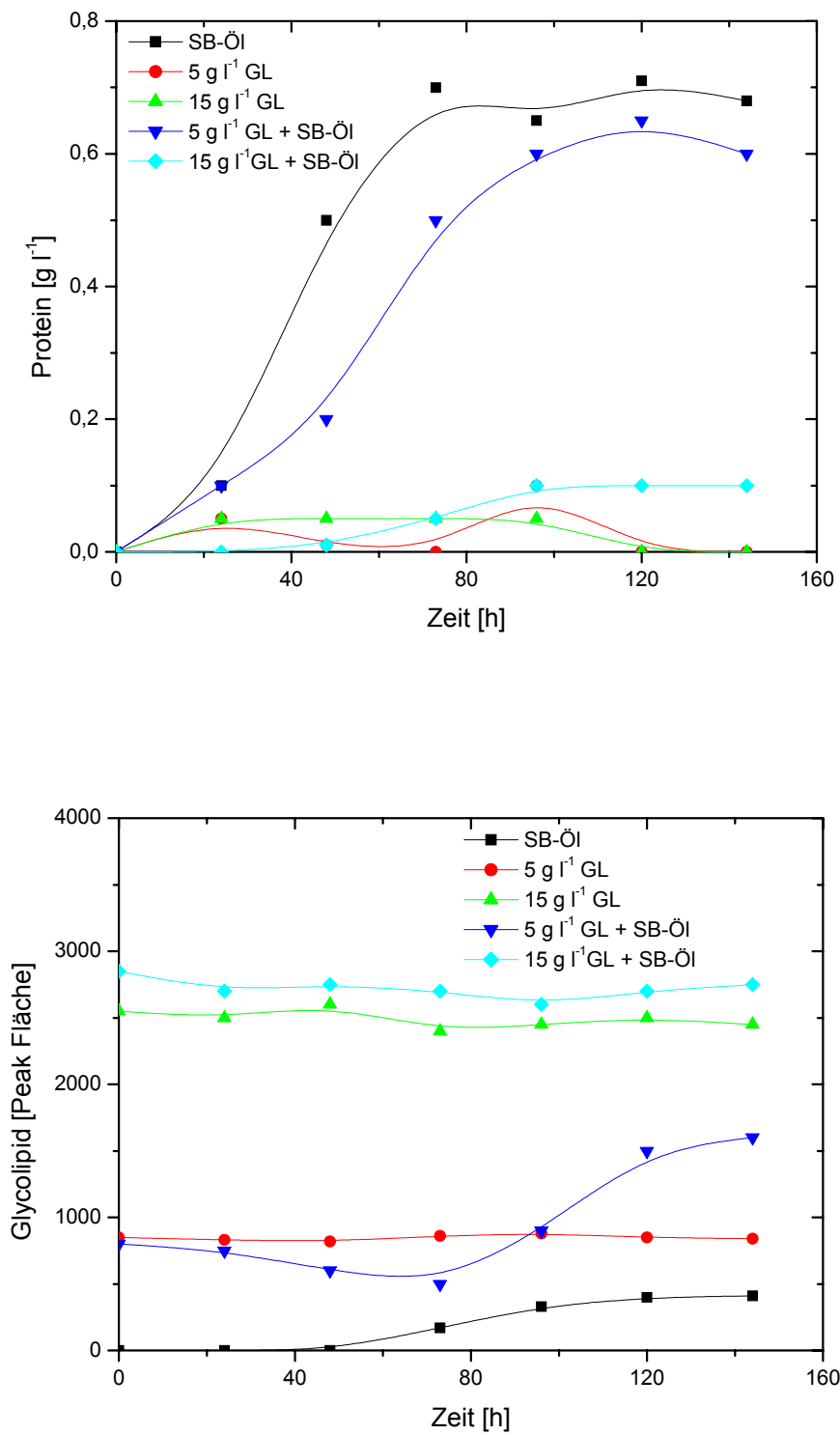


Abbildung 3.16: Protein- und Glycolipidkonzentration der Glycolipidabbauversuche.

3.3.5 Einfluss der Biomassekonzentration auf die Produktion

Die vorangegangenen Kultivierungen hatten gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der erreichbaren Glycolipidkonzentration und der im Bioreaktor vorliegenden Biomassekonzentration besteht. So zeigte sich bei einem ungewollten Überschäumen der Kultursuspension und damit dem Verlust von Biomasse aus dem Reaktor, dass die Produktausbeuten niedriger ausfielen als erwartet. Deshalb sollte hier der Zusammenhang zwischen Produkt- und Biomassekonzentration näher untersucht werden.

3.3.5.1 Einfluss der EDTA-Konzentration

Mit Ausnahme einiger EDTA-abbauender Organismen [NÖRTEMANN und HEMPEL, 1994; KLÜNER et al., 1994] reagieren Bakterien im allgemeinen sehr empfindlich auf komplexierende Reagenzien, insbesondere auf EDTA. Zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} und Zn^{2+} spielen eine wichtige Rolle im Aufbau und in der Organisation der Zellwand [SALTON, 1968, VARA, 1992]. Die Entfernung dieser bivalenten Kationen aus dem System durch Chelatbildung mit EDTA kann zur Destabilisierung der äußeren Membran und damit zur Erhöhung der Permeabilität, bis hin zur Zelllysis führen. Eine Veränderung der Permeabilität wiederum kann aber die Freisetzung von Metaboliten durch die äußere Membran in die Kultursuspension begünstigen. Untersuchungen zur Produktion von zellwand-gebundenen Trehalosemycolaten mit dem Stamm *Rhodococcus erythropolis* [RISTAU, 1983] zeigten zum Beispiel eine steigende Glycolipidausbeute bei Zugabe von 1.1 g l^{-1} EDTA zum Medium. Besonders gute Ergebnisse wurden mit einer kontinuierlichen EDTA-Zugabe im Bioreaktor erhalten.

Voruntersuchungen mit *Tsukamurella spec.* [VOLLBRECHT, E., 1999] hatten gezeigt, dass EDTA im Medium zu einem verbesserten homogenen Wachstum führte und die Ausschüttung der produzierten Glycolipide ins Medium erleichterte. Es wurde ein Optimum für die EDTA-Konzentration beschrieben, bei dem eine vollständige Ablösung der Glycolipide von den Zellwänden und damit eine erhöhte Produktivität erreicht wurde. Dieses allerdings nur bei geringer Biomasse- und Glycolipidkonzentration.

Zur Verifizierung der Untersuchungen von Vollbrecht wurde der Einfluss der EDTA-Konzentration auf die Produkt- und Biomassekonzentration erneut im Schüttelkolbenmaßstab untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Es zeigte sich, wie schon beschrieben, dass bei einer Konzentration um 0.25 g l^{-1} EDTA Produkt- und Biomassekonzentration ein Maximum besaßen. Gleichzeitig lagen, entgegen den Untersuchungen von Heckmann [HECKMANN, 1995], die Glycolipide ab einer Konzentration von 0.2 g l^{-1} EDTA nicht mehr zellwandassoziiert, sondern in der Kultursuspension gelöst vor. Allerdings waren die beobachteten Biomasse- und Glycolipidkonzentration wesentlich geringer als die, die durch Kultivierung im Bioreaktor erreicht wurden.

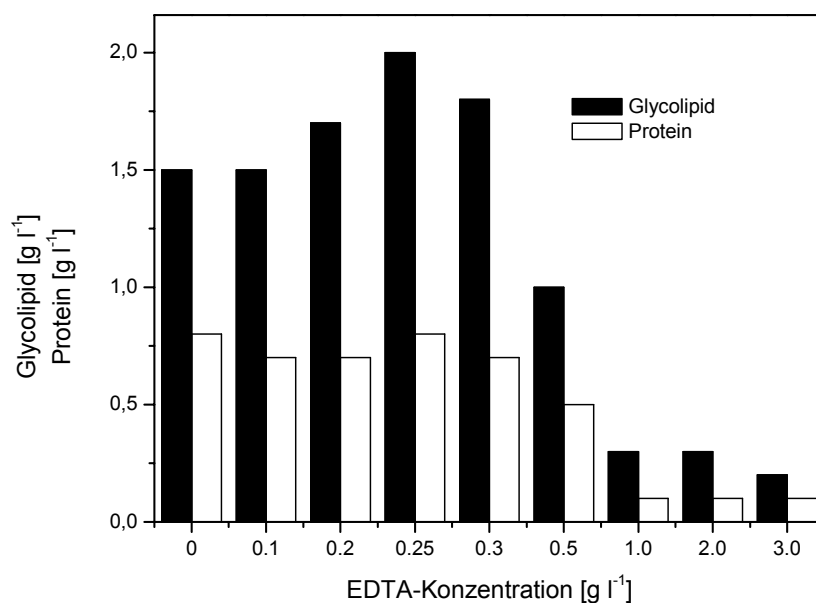


Abbildung 3.17: Einfluss verschiedener EDTA-Konzentrationen auf die Biomasse- und Glycolipidbildung von *Tsukamurella spec.* im Schüttelkolbenmaßstab. M1-Medium, Trispuffer, manuelle pH-Korrektur auf 7.5, 20 g l^{-1} Sonnenblumenöl, 150 h, 30°C , 100 Upm.

Um den Einfluss der EDTA-Konzentration bei höheren Biomasse- und Produktkonzentrationen zu untersuchen wurden drei Bioreaktorkultivierungen mit unterschiedlicher EDTA-Zudosierung durchgeführt. Da im Schüttelkolbenmaßstab ein positiver Effekt auf Wachstum und Produktion nur bis zu einer Konzentration von 0.25 g l^{-1} beobachtet wurde, erfolgte die Erhöhung der EDTA-Konzentration erst nach Beendigung der exponentiellen Wachstumsphase. Gleichzeitig sollte hier untersucht

werden, ob bei den verwendeten EDTA-Konzentrationen tatsächlich die gesamte Glycolipidmenge in der Kultursuspension vorliegt oder Restmengen zellwandassoziiert verbleiben. Dazu wurden die Glycolipide zum Vergleich einmal nur aus der Suspension und zum anderen aus der Suspension mit Biomasse extrahiert. Bei der Kultivierung mit 0.25 g l^{-1} EDTA konnte eine Biomasse von 17 g l^{-1} und eine Glycolipidkonzentration von 13 g l^{-1} erreicht werden (Abbildung 3.18). Etwa 25% der Glycolipide verblieben hierbei jedoch zellwandgebunden. Dies zeigte, dass bei höheren Biomasse- und Produktkonzentration keine vollständige Ablösung ins Medium erfolgte. Die Kultivierung, bei der nach der exponentiellen Wachstumsphase eine weitere Zugabe von 0.25 g l^{-1} auf insgesamt 0.5 g l^{-1} EDTA erfolgte, ergab bei etwa gleicher Biomassekonzentration nur 10 g l^{-1} Produkt. Durch die gesteigerte Permeabilität der Zellen lag der zellassoziierte Anteil nur bei etwa 20%. Durch die Erhöhung der EDTA-Konzentration auf 1 g l^{-1} sank die Produktausbeute auf 4 g l^{-1} . Allerdings lag hier das gesamte Produkt frei im Medium vor. Eine Erhöhung der EDTA-Konzentration verbesserte zwar die Ausschüttung der Produkte ins Medium; dafür wurde die Produktbildung allerdings erheblich reduziert.

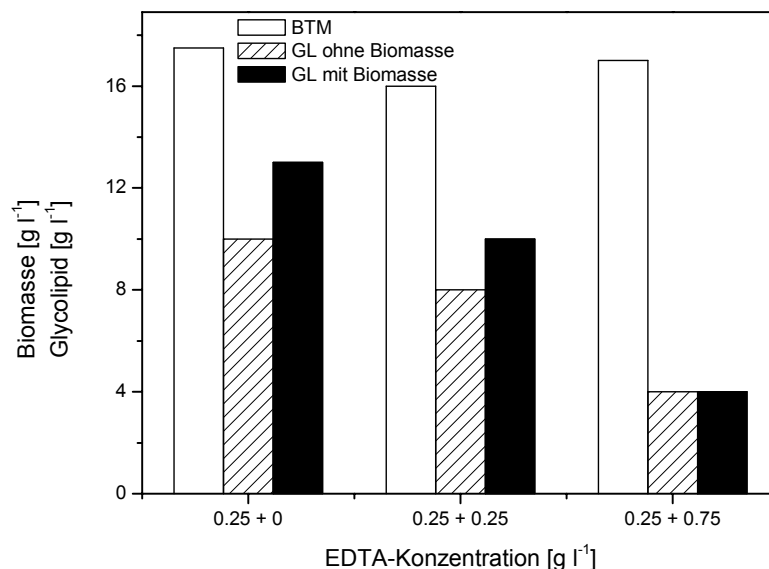


Abbildung 3.18: Einfluss unterschiedlicher EDTA-Konzentrationen auf die Glycolipidbildung von *Tsukamurella spec.* im 30l Bioreaktormaßstab.

3.3.5.2 Erhöhung der Biomasse durch Batchbetrieb

Die durch die vorangegangenen Optimierungsschritte erzielten Ergebnisse, gleichzeitige P- und N-Limitierung, EDTA-Einsatz zur Reduzierung der Produktanhaftung an der Biomasse und Vermeidung des Überschäumens durch Einsatz von Substrat als Antischaummittel, sollten nun zusammengeführt werden.

Dazu wurde zum einen die Fütterungsstrategie von fed-batch auf batch umgestellt, wobei die Anfangssubstratkonzentration wesentlich erhöht wurde. Ein negativer Einfluss einer hohen Substratkonzentration im Reaktor auf das Wachstum und die Produktion hatte sich nicht ergeben (s. Kapitel 3.3.4.1). Vielmehr sollte dadurch die Schaumentwicklung minimiert und einer etwaigen Substratlimitierung entgegengewirkt werden. Allerdings wurde auch weiterhin Substrat bei drohender Überschäumung zudosiert. Des Weiteren sollte die Biomassekonzentration durch Erhöhung der Ammoniumkonzentration verdoppelt werden, um die Produktkonzentration im Gesamtsystem zu erhöhen, die sich aus den im Medium gelösten Glycolipiden und den an den Zellen anhaftenden zusammensetzt. Weiterhin wurden die Untersuchungen in einem 50 l Bioreaktor unter Verwendung von 20 l Kulturvolumen durchgeführt. Das Leervolumen im Reaktor diente zur Schaumausdehnung.

Bei ersten Untersuchungen (nicht dargestellt) zeigte sich, dass bei Beibehaltung des N/P-Verhältnisses und Verdopplung der N-Konzentration keine N-Limitierung zu erzielen war. Der Phosphatverbrauch stieg nicht wie erwartet linear bei Erhöhung der jeweiligen Konzentrationen. Das empirisch ermittelte N/P-Verhältnis, das bei einer bestimmten Biomassekonzentration zu einer gleichzeitigen Limitierung führte, war nicht auf alle Konzentrationen übertragbar. Erst bei einer weiteren Kultivierung mit einer Vervierfachung der Phosphatkonzentration erbrachte bei gleichzeitiger Verdopplung der Stickstoffkonzentration das gewünschte Ergebnis. Die Kultivierungsbedingungen zeigt Tabelle 3.13. Die vorgelegte Substratkonzentration entsprach der doppelten Menge, die bis dato bei geringerer Biomassekonzentration verbraucht wurde (beibehaltenes C/N-Verhältnis).

Tabelle 3.13: Bedingungen für die Batch-Kultivierung bei erhöhter Biomassekonzentration im 50 l Bioreaktor.

Kultivierungsbedingungen		Kultivierungsbedingungen	
Volumen	20 l Kulturvolumen	Begasung	0.4 v/vm
Drehzahl	550 Upm	Medium	M 1 ohne Phosphatpuffer
Rührertyp	Rushton Turbinen		1.78 g l ⁻¹ K ₂ HPO ₄
Temperatur	30 °C		7.44 g l ⁻¹ (NH ₄)SO ₄
pH	geregelt auf 7.5		120 + 70 g l ⁻¹ SB-Öl

Die Verdopplung der Ammoniumkonzentration führte zu einer annähernden Verdoppelung der Biomassekonzentration von 18 g l⁻¹ (Abschnitt 3.3.3.4) auf 40 g l⁻¹. Nach 23 h war die exponentielle Wachstumsphase beendet (Abbildung 3.19) und es konnte keine Phosphat- und Ammoniumionen mehr detektiert werden. Mit Beginn der stationären Phase stieg die Glycolipidkonzentration stark an und erreichte nach 70h ihr Maximum von 22.5 g l⁻¹. Erst am Ende der Kultivierung konnte ein leichtes Absinken der Konzentration beobachtet werden. Dies konnte allerdings auf die starke Schaumbildung nach 120 h zurückgeführt werden. Dieser Schaumentwicklung wurde mittels Substratnachdosagen begegnet, was deutlich im Verlauf des pO₂ zu beobachten ist. Der respiratorische Koeffizient stieg in der exponentiellen Phase auf im Mittel 0.7 an und behielt diesen Wert über den gesamten Verlauf der Kultivierung. Unter den gewählten Bedingungen wurden am Ende der Kultivierung alle drei Glycolipide in nahezu gleich großen Anteilen gebildet (nicht dargestellt). Wiederum setzte die Synthese von GL 1 bereits in der exponentiellen Phase ein, während GL 2 und GL 3 erst mit Beginn der stationären Phase gebildet wurden.

Die in Tabelle 3.14 dargestellten Kultivierungsparameter beziehen sich auf den gesamten Kultivierungszeitraum. Berücksichtigt man allerdings, dass die maximal erreichte Glycolipidkonzentration bereits schon nach 70 h erreicht war, so erhält man, unter Berücksichtigung der bis dahin verbrauchten Substratmenge von 100 g l⁻¹, einen deutlich höheren spezifischen Ausbeutekoeffizienten von $Y_{P/S} = 0.23$ und eine wesentlich größere volumetrische Produktivität von $P_V = 0.32 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

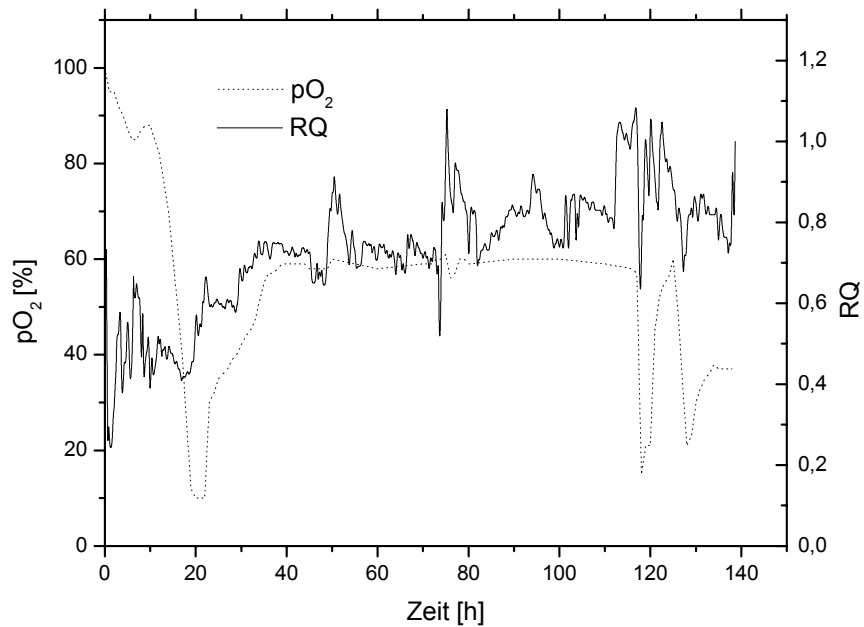
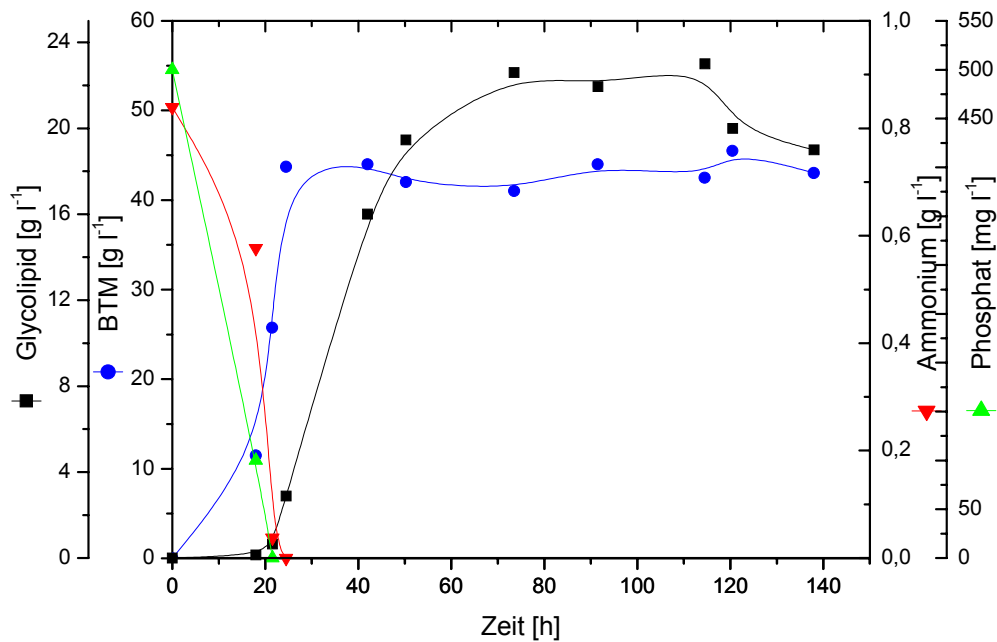


Abbildung 3.19: Kultivierungsparameter während der P- und N- limitierten Produktion von Glycolipiden durch eine erhöhte Biomassekonzentration von *Tsukamurella spec.* im 50 l Bioreaktor im Batch-Betrieb. 20 l Kulturvolumen, 550 Upm, 30°C, pH 7.5, 0.4 v/vm, 190 g/l⁻¹ Sonnenblumenöl.

Tabelle 3.14: Kultivierungsparameter der Batch-Kultivierung mit verdoppelter Biomassekonzentration bezogen auf den gesamte Kultivierungszeitraum von 140 h.

Parameter		Parameter	
Produktausbeute	22.5 g l ⁻¹	P _V	0.16 g l ⁻¹ h ⁻¹
Biomasse (BTM)	40 g l ⁻¹	Y _{P/X}	0.56
Substratverbrauch	130 g l ⁻¹	Y _{P/S}	0.17

3.3.6 Einfluss anderer Pflanzenöle auf die Produktzusammensetzung und -konzentration

Eine Änderung der Produktzusammensetzung oder die Veränderung des Fettsäuresubstituentenmusters von Biotensiden bei der Kultivierung auf unterschiedlichen Substraten oder bei Verwendung von Cosubstraten ist bei verschiedenen Organismen wie *Ustilago maydis* oder *Candida bombicola* beobachtet worden [BRAKEMEIER, A., 1997 ; SPÖCKNER et al., 1999; MANZKE, C., 1998]. Weiterhin lassen die Kenntnisse zur Biosynthese von Glycolipiden aus Triglyceriden und Fettsäuren den Schluss zu, dass die Kohlenstoffwasserstoffketten des Lipidteiles der Tenside direkt oder nach Modifikation aus den Triglyceriden inkorporiert werden können [LANG und WAGNER, 1993].

In vorangegangenen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass auch *Tsukamurella spec.* in der Lage ist, auf den unterschiedlichsten Substraten zu wachsen und dass gerade bei dem Einsatz von Pflanzenölen Glycolipide gebildet werden [VOLLBRECHT, 1999]. Allerdings erfolgte hier nur eine quantitative Aussage über die Produktionsleistung im Schüttelkolbenmaßstab und keine genauere Untersuchung der gebildeten Glycolipidstrukturen oder eine Optimierung im Hinblick auf eine Bioreaktorkultivierung.

Auch wenn beim Wechsel der Substratquelle aufgrund des angenommen Syntheseweges keine wesentliche Strukturänderung in Bezug auf das Zuckergrundgerüst der Glycolipide zu erwarten ist, so könnte allerdings durch diesen Wechsel möglicherweise eine Änderung des Fettsäuresubstituentenmusters oder auch eine Änderung der Glycolipidzusammensetzung erfolgen.

Vor einer etwaigen Bioreaktorkultivierung wurde das Potential der Zellen zur Glycolipidproduktion auf verschiedenen Pflanzenölen im Schüttelkolbenmaßstab überprüft. Mittels DC und HPLC konnten keine Unterschiede in der Glycolipidzusammensetzung festgestellt werden. Nur in der Menge der gebildeten Glycolipide und der Zellmasse waren deutliche Unterschiede zu erkennen (Abbildung 3.20).

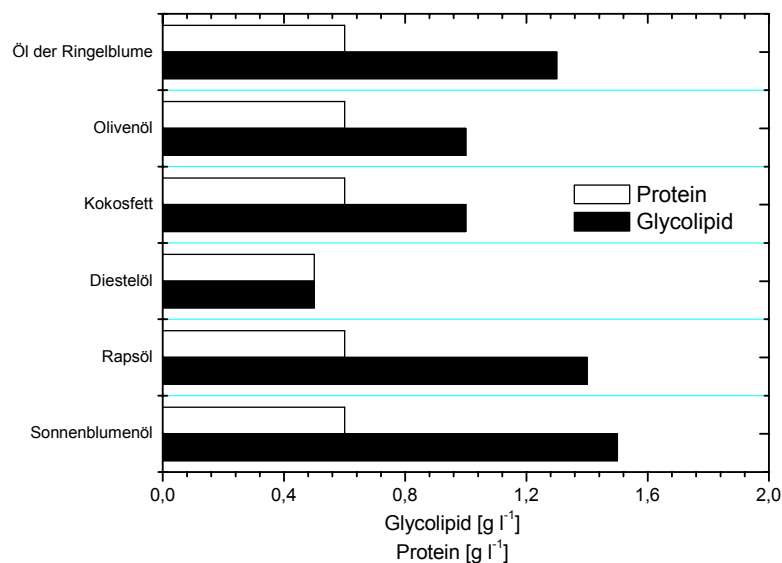


Abbildung 3.20: Glycolipidbildung von *Tsukamurella spec.* auf verschiedenen Pflanzenölen. M1 mit Variation der C-Quelle 20 g l⁻¹, 72 h, 30 °C, 100 Upm.

Zum einen wegen der relativ guten Ausbeute im Vergleich zum Sonnenblumenöl und zum anderen aufgrund der interessanten Zusammensetzung bezüglich ihrer Fettsäurezusammensetzung wurden Bioreaktorkultivierungen mit Rapsöl und Calendulaöl (Öl der Ringelblume) durchgeführt. Im Gegensatz zum ölsäurereichen Sonnenblumenöl, welches zu über 80 % Ölsäure (18:1) enthält, liefert Rapsöl bis zu 60 % Erucasäure (22:1) und Calendulaöl bis zu 60 % Calendulasäure (Octadec-8,1,10-trans, 12-cis-triensäure).

a) Kultivierung auf Rapsöl

Gemäß den Ergebnissen aus den Voruntersuchungen wurde eine Batch-Kultivierung auf Rapsöl durchgeführt (Tabelle 3.15). Auf eine detaillierte Darstellung des Kultivierungsverlauf wurde verzichtet, da er sich nicht wesentlich von dem mit Sonnenblumenöl als Substrat ermittelten Versuch unterschied.

Tabelle 3.15: Bedingungen für die Batch-Kultivierung von *Tsukamurella spec* auf Rapsöl in einem 50 l Bioreaktor.

Kultivierungsbedingungen		Kultivierungsbedingungen	
Volumen	20 l Kulturvolumen	Begasung	0.4 v/vm
Drehzahl	550 Upm	Medium	M 1 ohne Phosphatpuffer
Rührertyp	Rushton Turbinen		1.7 g l ⁻¹ K ₂ HPO ₄
Temperatur	30 °C		7.4 g l ⁻¹ (NH ₄)SO ₄
pH	geregelt auf 7.5		120 + 80 g l ⁻¹ Rapsöl

Die Limitierung und damit das Ende der exponentiellen Wachstumsphase war, entgegen der Kultivierung auf Sonnenblumenöl, erst nach 50 h erreicht. Diese ist auf eine wesentlich längere Lag-Phase zurückzuführen, obwohl das Inokulum auch auf Rapsöl kultiviert wurde und somit eine Anpassung des Stoffwechsels auf ein neues Substrat nicht notwendig war. Die eigentliche exponentielle Phase und damit die Wachstumsgeschwindigkeit entsprach dagegen der bei Sonnenblumenöl. Nach 90 h wurde ein Produktmaximum von 13 g l⁻¹ (58 % des Produktmaximums bei Sonnenblumenöl) erreicht und damit ein P_V von 0.14 g l⁻¹h⁻¹. Im Gegensatz zur Kultivierung auf Sonnenblumenöl, war hier nur eine schwache Aggregatbildung der Biomasse zu beobachten. Die Produktbildungsparameter bei Beendigung der Kultivierung nach 140 h sind in Tabelle 3.16 dargestellt.

Die Untersuchung der Glycolipidzusammensetzung über den Kultivierungsverlauf ergab keinen Unterschied zu der Kultivierung auf Sonnenblumenöl. Auch hier wurde GL 1 bereits in der exponentiellen Phase gebildet und gegen Ende der Produktionsphase lagen alle drei Glycolipide in gleichen Verhältnissen vor.

Auch die massenspektroskopische Analyse der drei gebildeten Glycolipide ergab in ihrer prozentualen Zusammensetzung in Bezug auf die Acylsubstituenten keinen signifikanten Unterschied zu den aus Sonnenblumenöl gewonnenen Glycolipiden (s. Kapitel 6).

Tabelle 3.16: Produktbildungsparameter der Batch-Kultivierung auf Rapsöl nach 140h Kultivierungsdauer.

Parameter		Parameter	
Produktausbeute	13 g l ⁻¹	P_V	0.09 g l ⁻¹ h ⁻¹
Biomasse (BTM)	39 g l ⁻¹	$Y_{P/X}$	0.33
Substratverbrauch	110 g l ⁻¹	$Y_{P/S}$	0.12

b) Kultivierung auf Calendulaöl

Auch hier wurde eine Batch-Kultivierung mit den in Tabelle 3.17 dargestellten Bedingungen durchgeführt. Ebenfalls war eine wesentlich verlängerte Lag-Phase zu beobachten (nicht dargestellt). Die Glycolipidkonzentration stieg nach der Limitierung kontinuierlich an und erreicht innerhalb des Kultivierungszeitraumes kein Maximum. Nach 190 h konnte eine Konzentration von 14 g l^{-1} ermittelt werden (s. Tabelle 3.18)

Tabelle 3.17: Bedingungen für die Batch-Kultivierung von *Tsukamurella spec* auf Calendulaöl in einem 10 l Bioreaktor.

Kultivierungsbedingungen		Kultivierungsbedingungen	
Volumen	5 l Kulturvolumen	Begasung	0.4 v/vm
Drehzahl	900 Upm	Medium	M 1 ohne Phosphatpuffer
Rührertyp	Rushton Turbinen		$1.78 \text{ g l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$
Temperatur	30 °C		$7.44 \text{ g l}^{-1} (\text{NH}_4)\text{SO}_4$
pH	geregelt auf 7.5		120 g l^{-1} Calendulaöl

Unter gleichen Bedingungen lag die gebildete Biomasse mit 50 g l^{-1} 25 % höher als bei der Kultivierung mit Sonnenblumenöl. Auch hier war keine ausgeprägte Aggregatbildung der Biomasse zu beobachten.

Die Produktzusammensetzung im zeitlichen Verlauf der Kultivierung unterschied sich deutlich von den vorangegangenen Kultivierungen (Abbildung 3.21). Während der exponentiellen Phase konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Erst beim Eintritt in die Limitierung erfolgte die Produktion aller drei Glycolipide. Im Verlauf der Kultivierung blieben dabei die Konzentrationen von GL 1 und GL 2 nahezu konstant. GL 3 stieg dagegen kontinuierlich an und stellte am Ende mit 60 % das Hauptprodukt der Mischung dar.

Tabelle 3.18: Produktbildungsparameter der Batch-Kultivierung auf Calendulaöl nach 190 h.

Parameter		Parameter	
Produktausbeute	14 g l^{-1}	P_V	$0.07 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$
Biomasse (BTM)	50 g l^{-1}	$Y_{P/X}$	0.28
Substratverbrauch	100 g l^{-1}	$Y_{P/S}$	0.14

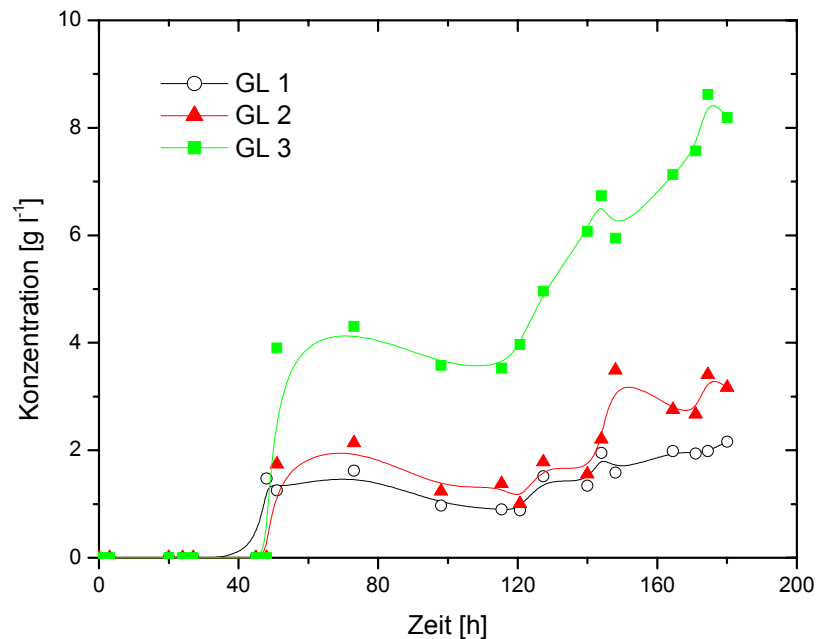


Abbildung 3.21: Zusammensetzung des Glycolipidgemisches im Verlauf der Kultivierung mit Calendulaöl.

Eine Änderung der Produktstruktur durch Änderung des Substratangebotes wurde mittels NMR untersucht. Dabei zeigten sich für GL 2 und GL 3 sowohl bei der Art der Acylsubstituenten als auch bei deren prozentualer Verteilung keine signifikanten Unterschiede zu den aus Sonnenblumenöl produzierten Glycolipiden. Bei GL 1 konnte allerdings eine Verminderung der Molekularmasse um zwei Einheiten bei allen drei bekannten Kombinationsmöglichkeiten der Acylsubstituenten beobachtet werden (Kapitel 6). Dies ließ den Schluss zu, dass entweder eine zweifach-ungesättigte oder aber zwei einfach-ungesättigte Fettsäuren als Acylreste vorliegen. Ausgehend von der Struktur der angebotenen Calendulasäure, ist die Acylierung mit einer mehrfach-ungesättigten Fettsäure vorstellbar. Weitergehende Untersuchungen zur genaueren Identifizierung der acylierten Fettsäuren, wie die Hydrolyse der Glycolipide mit anschließender Strukturanalyse der Hydrolysate, konnten nicht mehr durchgeführt werden.

3.4 Aufarbeitung der Rohprodukte

Neben der Optimierung der mikrobiellen Produktion der Glycolipide stand auch die Entwicklung einer einfachen und effektiven Aufarbeitungstechnik im Blickpunkt dieser Arbeit.

Die nach Abbruch der Kultivierung aus dem Bioreaktor gewonnene Kultursuspension enthielt stets noch große Mengen an Substrat, die, jeweils abhängig von den jeweiligen Konzentrationen, mit den oberflächenaktiven Glycolipiden, eine über mehrere Wochen stabile Emulsion bildete. Die Zellen besaßen bei Wachstum auf hydrophoben Substraten eine sehr lipophile Oberfläche. Sie befanden sich an der Oberfläche oder im Inneren der fein verteilten Öltröpfchen. Eine einfache Abtrennung der Biomasse durch Zentrifugation war somit nicht möglich. Außerdem hatte sich bei den Untersuchungen zur EDTA-Optimierung (Abschnitt 3.3.5.1) gezeigt, dass die Biomasse selbst auch Träger des Produktes und so bei der Gewinnung der Produkte mit einzubeziehen war.

3.4.1 Down-stream processing nach der Kultivierung

Bei der Aufarbeitung der Produkte nach erfolgter Kultivierung wurden unterschiedliche Aufarbeitungsmethoden auf ihre Tauglichkeit im Litermaßstab untersucht.

a) Chromatographie

Der Kulturüberstand wurde erschöpfend mit MTBE extrahiert. Die Phasentrennung wurde dabei durch noch im Überstand vorhandene Zellen, die sich bevorzugt in der organischen Phase aufhielten, erschwert.

Zur Abtrennung des überschüssigen Substrates und der im Lösungsmittel vorhandenen Zellen und deren Zellbruchstücke erfolgte eine adsorptive Filtration über Kieselgel (Flash-Chromatographie; Abschnitt 2.5.3). Dazu wurde das Lösungsmittel aus dem Rohextrakt entfernt, der Rückstand auf eine Kieselgelsäule aufgebracht und mit MTBE die Ölreste ausgewaschen. Anschließend erfolgte die

Eluierung der Glycolipide mit Methanol von der Säule. Dabei konnte eine Anreicherung von 90 – 95 % erreicht werden.

Nachteil dieser Methode ist zum einen die geringe Kapazität der Kieselgelsäulen. Hier musste ein Kompromiss zwischen Säulengröße und Elutionsdauer gefunden werden. Weiterhin musste beachtet werden, dass Kieselgel in geringen Mengen in Methanol löslich ist und sich damit ein weiterer Aufreinigungsschritt für die Entfernung des Kieselgels anschließen musste.

b) Flüssig/Flüssig-Extraktion

Zur Vereinfachung der Aufreinigung von großen Mengen von Glycolipiden sollte auf Grundlage der unterschiedlichen Löslichkeit von Substrat und Produkt ein effektives Extraktionsverfahren entwickelt werden (Abbildung 3.22).

Zur Isolierung der Produkte aus der wässrigen Phase und gleichzeitiger Zurückhaltung der Biomasse in der selbigen erfolgte eine erschöpfende Extraktion der Kultursuspension mit MTBE und anschließender Zentrifugation des Gemisches in einer Kühlzentrifuge. Nach der Phasentrennung durch die Zentrifugation befanden sich die Glycolipide und das noch vorhandene Substrat in der organischen und die Zellen und Zellbuchstücke in der wässrigen Phase. Das MTB-Gemisch wurde einrotiert und anschließend mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen extrahiert.

So führte eine Aufnahme des Gemisches in Methanol und eine anschließende zweimalige Extraktion dieser Lösung mit Cyclohexan zu einer befriedigenden Aufreinigung. Nach der Phasentrennung befanden sich nahezu 95 % der Glycolipide und nur noch Spuren des Substrates und freier Fettsäuren in der Methanolphase. Zur weiteren Verarbeitung der Produkte als auch zur Steigerung des Aufreinigungsgrades mittels MPLC (Abschnitt 2.5.4) war dieses Ergebnis ausreichend.

Weitere Untersuchungen mit einem Dreikomponentensystem und der Protonierung der Produkte bei niedrigen pH-Werten erbrachten noch eine weitere Steigerung des Reinheitsgrades. So konnte mit einer einmaligen Extraktion des MTBE-Extraktes in einem Wasser(pH4)/Methanol/n-Hexan (2/4/1) Gemisch eine 100%ige Anreicherung der Glycolipide in der Wasser/Methanol-Phase erzielt werden. Damit war eine effektive und kostengünstige Aufarbeitungsmethode gefunden.

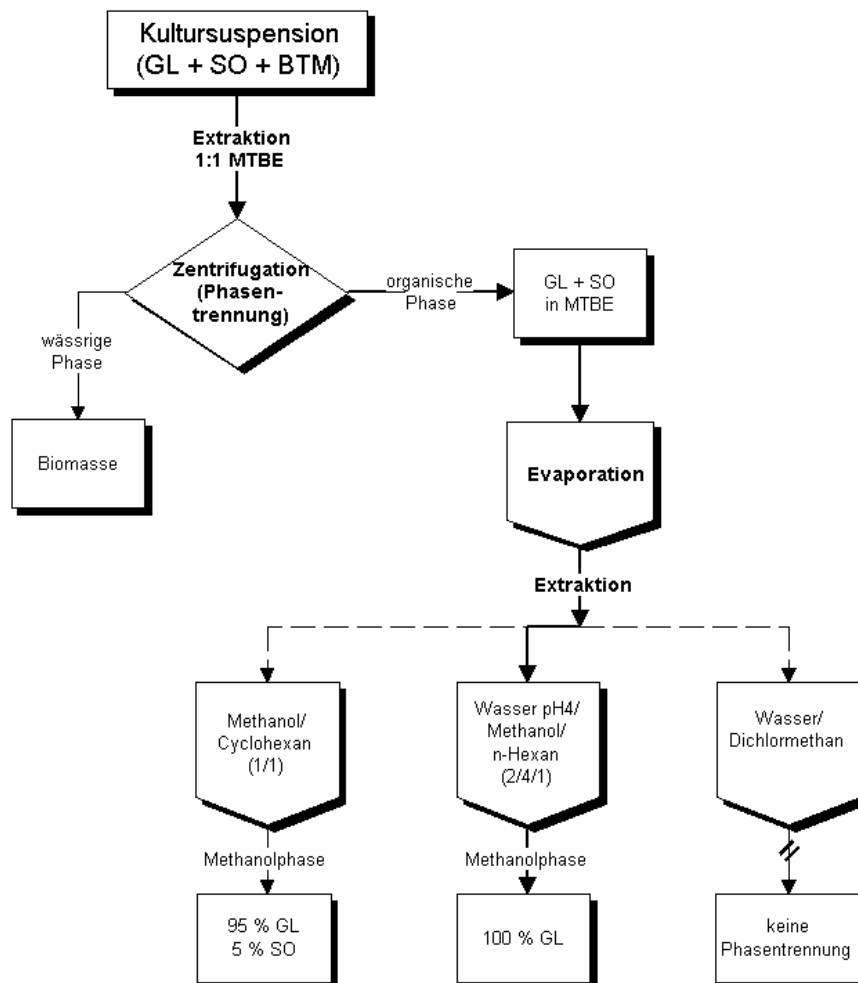


Abbildung 3.22: Aufarbeitungsschema Extraktion.

3.4.2 Down-stream processing während der Kultivierung

Neben der Aufarbeitung nach erfolgter Produktion erschien es sinnvoll, die Produkte schon während der Kultivierung aus dem Prozess zu entfernen. Zum einen die Schwierigkeiten bei der Abtrennung der Biomasse, die Zentrifugation von Lösungsmittelgemischen stellt ein nicht unbedingt geeignetes Verfahren dar, als auch die gefundene Produkthemmung (Abschnitt 3.3.4.2) ließen Überlegungen in dieser Richtung zu.

Untersucht werden sollte hier, ob mittels Adsorbentien eine Entfernung der Glycolipide bei laufender Produktion möglich ist. Zur Anwendung kamen dabei Amberlite (XAD) der Firma Röhm und Haas (Röhm and Haas, Philadelphia, USA), die ein polymeres Adsorbent mit definiertem Polymerisationsgrad, Porosität und

Hydrophobizität auf aromatischer Basis darstellen. Sie dienen vorrangig zur Adsorption von hydrophoben niedermolekularen Substanzen aus polaren Lösungsmitteln.

Zur Kontrolle der Adsorptionsfähigkeit wurden Kultursuspensionen mit Amberliten unterschiedlicher Hydrophobizität (XAD 4, 7, 16) versetzt, bei 4 °C und 140 Upm für 6 h geschüttelt und anschließend per Filtration wieder aus der Suspension entfernt. Anheftende Suspension konnte durch mehrmaliges Waschen mit isotonischer Kochsalzlösung entfernt werden. Anschließend erfolgte die Extraktion mittels Methanol oder MTBE.

Tabelle 3.19: Adsorptionsvermögen verschiedener Amberlite.

Amberlite	Adsorptionsvermögen [$\text{g}_{\text{Adsorbens}}/\text{kg}_{\text{Adsorbtionsmittel}}$]			
	Extraktion mit MTBE		Extraktion mit Methanol	
	Glycolipide	Öl	Glycolipide	Öl
XAD 4	1	1	1	1
XAD 7	4	4	3	1
XAD 16	3	2	2	0

Wie in Tabelle 3.19 zu erkennen, ist eine Adsorption der Glycolipide mit allen drei eingesetzten Amberliten möglich. Allerdings wird nicht nur das Produkt je nach verwendetem XAD und Extraktionsmittel, sondern auch das Substrat isoliert. Das höchste Adsorptionsvermögen konnte mit XAD 7 erzielt werden. Allerdings wurde hiermit auch die größte Menge an Substrat aus dem System entfernt. Mit XAD 16 in Verbindung mit Methanol konnten dagegen die Glycolipide ohne Verunreinigungen aufgereinigt werden.

Der Einsatz der Adsorptionsmethode in Form einer Chromatographiesäule als Bypass in einem laufenden Fermenter, bei dem die Kultursuspension kontinuierlich über das Adsorptionsmittel gepumpt wird, erwies sich als nicht praktikabel. Zum einen ist die Kapazität der verwendeten Amberlite-Materialien im Verhältnis zu der produzierten Menge an Glycolipiden viel zu gering. Die größte Schwierigkeit lag aber in der Realisierung des benötigten Bypasssystems. Durch die hohe Viskosität der Kultursuspension und die hohe Biomassekonzentration kam es schon bei Versuchen ohne Adsorptionsmaterial zur Blockierung des Bypasses.

3.5 Modifikation der nativen Oligosaccharidlipide von *Tsukamurella spec.*

Für spätere Untersuchungen zum physikochemischen Potential und zur Bioaktivität wurde angestrebt, mittels chemischer und biologischer Katalyse an den nativen Glycolipiden zu Folgeprodukten zu gelangen. Zunächst sollten aus den Glycolipiden die Zuckergrundgerüste durch chemische bzw. enzymatische Hydrolyse dargestellt werden. Anschließend sollten sowohl die nativen Glycolipide als auch die Zuckergrundgerüste enzymatisch modifiziert werden.

3.5.1 Darstellung der Zuckergrundgerüste G1, G2, und G3 durch alkalische Verseifung

Zur Gewinnung der Zuckergrundgerüste der Glycolipide wurde eine alkalische Verseifung (Kapitel 2.6.1) durchgeführt. Die Umsetzung erfolgte zu 100 %. In Abbildung 3.23 ist das Dünnschichtchromatogramm von den Produkten nach einer alkalischen Verseifung des Glycolipidgemisches dargestellt.

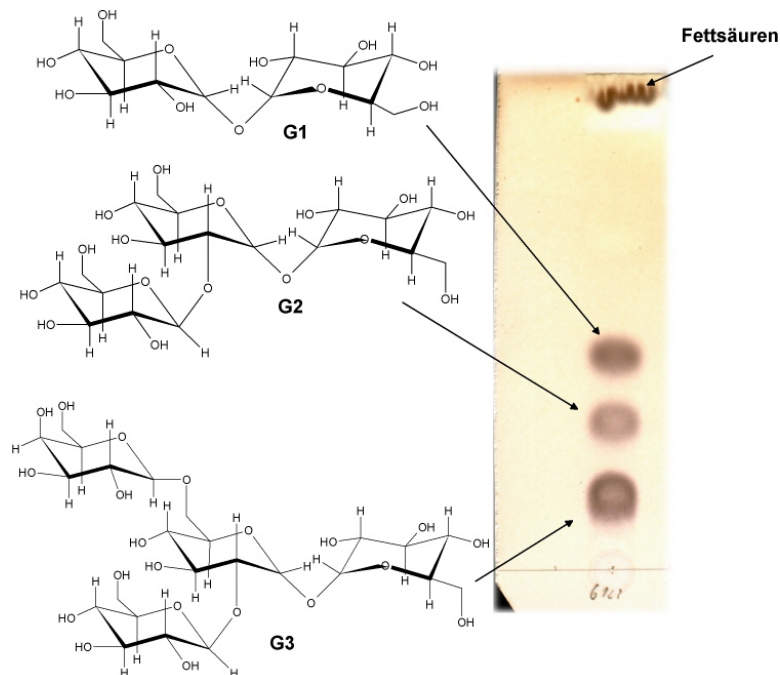


Abbildung 3.23: Dünnschichtchromatogramm des Ergebnisses einer alkalischen Verseifung des Glycolipidgemisches. NP-DC, Chloroform/Methanol/Wasser (30/40/4).

3.5.2 Enzymatische Hydrolyse der nativen Glycolipide

3.5.2.1 Hydrolyse mit Lipasen und Esterasen im wässrigen System

Es sollte die enzymatische Hydrolyse der Glycolipide unter Verwendung von Lipasen und Esterasen im gepufferten wässrigen System untersucht werden. Dazu wurden Ansätze mit allen Glycolipiden in Phosphatpuffer durchgeführt (mg-Maßstab).

In Tabelle 3.20 ist eine Übersicht der Ergebnisse der einzelnen Ansätze aufgeführt. Dabei zeigte sich, dass nur mit GL 1 unter den gewählten Bedingungen eine Hydrolyse zu erreichen war.

Tabelle 3.20: Enzymatische Hydrolyse der einzelnen Glycolipide in Phosphatpuffer (100mmol, pH 7,5), 2 ml Eppendorfgefäß, 1 mg Glycolipid + 5 -10 mg Enzym, T = 55°C, 24 h, 100 Upm im Schüttelwasserbad.

Enzym	GL 1	GL 2	GL 3
Novozyme 435	++	-	-
Lipozyme 60	+	-	-
Lipase aus <i>Candida cylindraceae</i>	+	-	-
Esterase (porcine pancreas)	-	-	-
Esterase (hog liver)	-	-	-

++ starke Umsetzung, + schwache Umsetzung, - keine Umsetzung

Abbildung 3.24 zeigt das Dünnschichtchromatogramm der vollständigen enzymatischen Hydrolyse von GL 1 unter Verwendung von Novozyme 435 nach 24 h. In Abbildung 3.26 ist das zugehörige Reaktionsschema dargestellt. Es konnten keine weiteren Substanzen als das Ausgangsprodukt (GL 1) und das Hydrolyse-Produkt (G 1) während der Reaktion detektiert werden. Die Identifizierung des Hydrolyse-Produktes G 1 (Trehalose) erfolgte sowohl mittels Dünnschichtchromatographie (RF-Wert) als auch durch NMR- und MS-spektroskopische Untersuchungen.

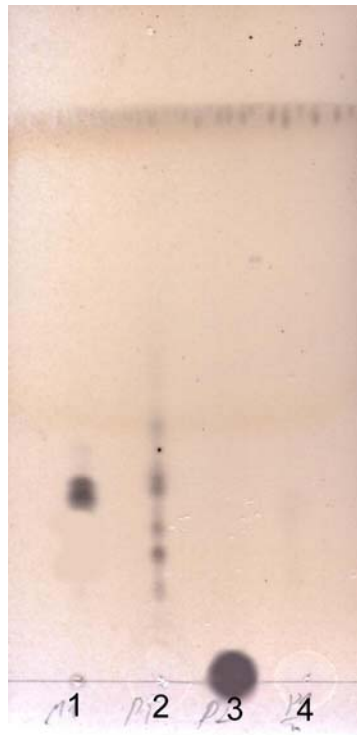


Abbildung 3.24: Dünnschichtchromatogramm der vollständigen enzymatischen Hydrolyse von GL 1 auf NP-Kieselgel; Laufmittelsystem: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/15/2) (v/v/v); Detektionsmittel: α -Naphthol
 1: GL1, 2: Glycolipidgemisch; 3: Enzymatischer Ansatz mit GL 1; 4: Enzymatischer Ansatz ohne GL 1

In einem weiteren Versuch wurde das Temperaturoptimum für die enzymatische Hydrolyse von GL 1 zu G 1 mittels Novozyme 435 ermittelt. Das Temperaturprofil ist in Abbildung 3.25 dargestellt.

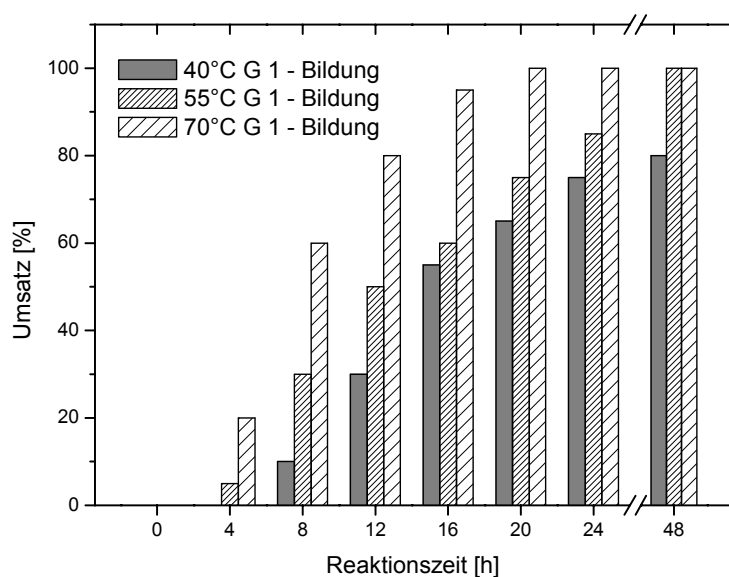


Abbildung 3.25: Einfluss der Temperatur auf die enzymatische Hydrolyse von GL1

Von den drei gewählten Temperaturen war 70°C die Temperatur, bei der die Hydrolyse von GL 1 am schnellsten abgeschlossen war. Bei dieser Temperatur war eine vollständige Umsetzung bereits nach 20h erfolgt. Nach 48h war auch bei T=55°C die vollständige Umsetzung zu beobachten. Bei T=40°C war nach Abbruch des Versuchs (48 h) noch kein 100%iger Umsatz erreicht. Mit längerer Versuchsdauer sollte dies aber auch hier zu erreichen sein.

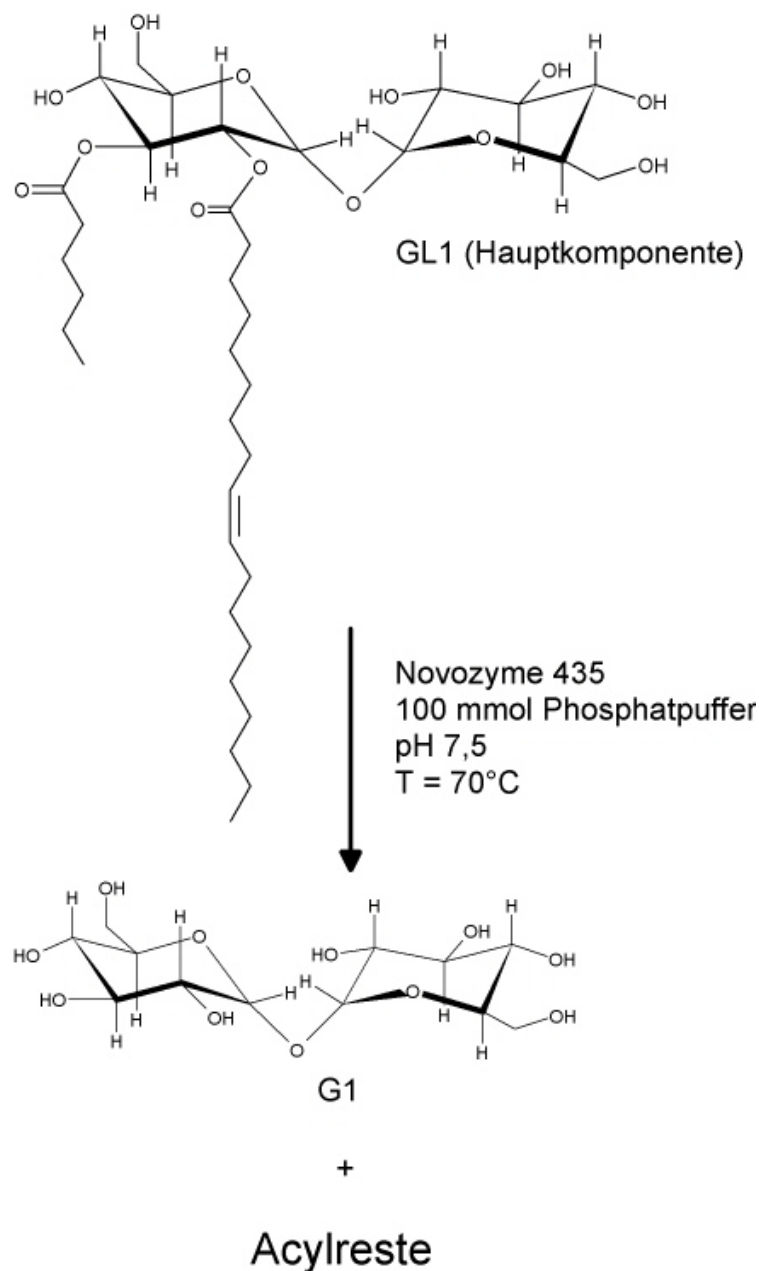


Abbildung 3.26: Enzymatische Hydrolyse von GL1.

3.5.2.2 Hydrolyse mit Lipasen und Esterasen in organischen Systemen

Ramm beschreibt die enzymatische Hydrolyse eines Glycoglycerolipids mittels einer Lipase in organischen Lösemitteln mit geringer Wasseraktivität [RAMM, 2001].

Um eine enzymatische Hydrolyse von GL 2 und GL 3 zu erreichen wurden, Untersuchungen in unterschiedlichen Lösemitteln durchgeführt. In Tabelle 3.21 ist eine Übersicht der Ergebnisse der verschiedenen Ansätze aufgeführt. Zum Einsatz kamen folgende Enzyme:

Novozyme 435, Lipozyme 60, Lipase aus *Candida cylindraceae*, Lipase aus *Rhizopus niveus*, Esterase (porcine pancreas), Esterase (hog liver).

In keinem der Versuche konnte die Hydrolyse von GL 2 und GL 3 beobachtet werden.

Tabelle 3.21: Enzymatische Hydrolyse von GL 2 und GL 3 mittels unterschiedlicher Lipasen und Esterasen in verschiedenen Lösemitteln.
2 ml Eppendorfgefäß, 1 mg Glycolipid + 5 - 10 mg Enzym, T = 55°C, 48 h, 100 Upm

Lösemittel	Enzym	GL 2	GL 3
dest. H ₂ O/tert-Amylalkohol (v/v) 1/1	alle getesteten Enzyme	-	-
dest. H ₂ O/tert-Amylalkohol (v/v) 1/10	alle getesteten Enzyme	-	-
dest. H ₂ O/Tetrahydrofuran (v/v) 1/1	alle getesteten Enzyme	-	-
tert-Amylalkohol (H ₂ O < 1 %)	alle getesteten Enzyme	-	-
Tetrahydrofuran (H ₂ O < 1 %)	alle getesteten Enzyme	-	-
MTBE (H ₂ O < 1 %)	alle getesteten Enzyme	-	-
Pyridin (H ₂ O < 1 %)	alle getesteten Enzyme	-	-
n-Hexan (H ₂ O < 1 %)	alle getesteten Enzyme	-	-
- keine Umsetzung			

3.5.2.3 Hydrolyse mit anderen hydrolytischen Enzymen

Da mit den eingesetzten Lipasen keine Umsetzung zu erzielen war, wurden weitere Enzyme, die Hydrolyseaktivität besitzen, untersucht. Glycosidasen katalysieren in Gegenwart von Wasser die Hydrolyse von glycosidischen Bindungen zwischen Zuckerbausteinen. Proteasen vermitteln in organischen Lösungsmitteln regioselektive Acylierungen von Zuckern [RICH et al., 1995; POLAT et al., 1997]. Deshalb wurde angenommen, dass in wässrigen Systemen eine Hydrolyse mit diesen Enzymen katalysiert werden könnte.

Tabelle 3.22: : Versuche zur Enzymatische Hydrolyse von GL 2 und GL 3 mittels Proteasen und Glycosidasen.

Enzyme: Naringinase (*Penicillium decumbens*), Hesperidinase (*Aspergillus niger*), α -Amylase (*Bacillus subtilis*), β -Glucosidase (Almonds), Amyloglucosidase (*Aspergillus niger*), Cellulase (*Penicillium fanicolum*), Protease (*Bacillus thermoproteolyticus*), Protease (*Bacillus lichenifo*)
 2 ml Eppendorfgefäß, 1 mg Glycolipid + 5 - 10 mg Enzym, T = 55°C, 48 h, 100 Upm

Lösemittel	Enzym	GL 2	GL 3
dest. H ₂ O/tert-Amylalkohol (v/v) 1/1	alle getesteten Enzyme	-	-
dest. H ₂ O/tert-Amylalkohol (v/v) 1/10	alle getesteten Enzyme	-	-
dest. H ₂ O/Tetrahydrofuran (v/v) 1/1	alle getesteten Enzyme	-	-
tert-Amylalkohol (H ₂ O < 1 %)	alle getesteten Enzyme	-	-
Tetrahydrofuran (H ₂ O < 1 %)	alle getesteten Enzyme	-	-
MTBE (H ₂ O < 1 %)	alle getesteten Enzyme	-	-
Pyridin (H ₂ O < 1 %)	alle getesteten Enzyme	-	-
Phosphatpuffer (100 mmol) pH 7,5	Naringinase aus <i>Penicillium decumbens</i> alle anderen Enzyme	-	+

+ schwache Umsetzung, - keine Umsetzung

Tabelle 3.22 stellt die Ergebnisse der Untersuchungen dar. Bis auf einen Ansatz mit GL 3 und Naringinase in Phosphatpuffer konnte keine Umsetzung beobachtet werden. Abbildung 3.27 zeigt das Dünnschichtchromatogramm dieser Umsetzung. Die in Spuren sichtbare neue Substanz besitzt einen ähnlichen R_f-Wert wie das Glycolipid GL 2. Es waren keine hydrolysierten Fettsäuren auf der DC zu finden.

Somit konnte eine Fettsäurehydrolyse ausgeschlossen werden. Da die Naringinase ein großes Substratspektrum hinsichtlich der Spaltung glycosidischer Bindungen besitzt (α -Rhamnosidase; β -Glucosidase) [NOROUZIAN et al., 2000; COMMEN et al., 1985], wurde postuliert, dass es sich bei dem Umsetzungsprodukt, auch auf Grund des ähnlichen Laufverhaltens, wahrscheinlich um GL 2 handelt. In Kapitel 3.5.5 wurden diesbezüglich weitere Untersuchungen vorgenommen.

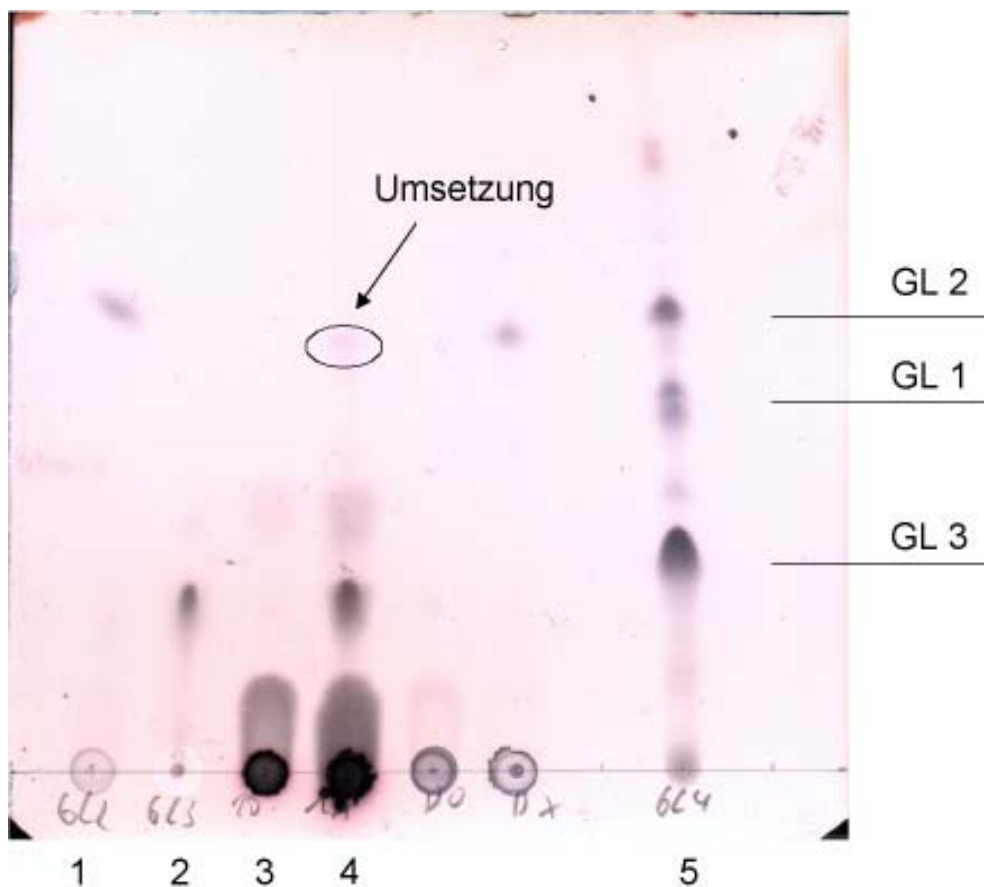


Abbildung 3.27: Enzymatische Umsetzung von GL 3 mit der Naringinase aus *Penicillium decumbens*.

3.5.3 Enzymatische Acylierung der nativen Oligosaccharidlipide

Untersuchungen zur enzymatischen Acylierung

Die Umkehrreaktion der durch Lipasen katalysierten Hydrolysereaktion wird ermöglicht, wenn die Biokatalyse in einem „enzym-freundlichen“ organischen Lösungsmittel durchgeführt wird. Besonders jene mit log P Werten > 3 (Cyclohexan, n-Hexan) fördern die Bildung von Esterbindungen, minimieren die Enzyminaktivierung und erlauben die Wiederverwendung des Biokatalysators [LANG. S., TROWITZSCH-KIENAST, W., 2002].

Durch erste Voruntersuchungen sollte gezeigt werden, ob eine enzymatische Acylierung der nativen Glycolipide GL 1, GL 2 und GL 3 mit unterschiedlichen Fettsäuren überhaupt möglich ist. Hinsichtlich der Acylierungsposition funktionalisieren Lipasen im allgemeinen an primären Hydroxylgruppen [LANG. S., TROWITZSCH-KIENAST, W., 2002]. Mindestens eine ist bei allen Glycolipiden vorhanden. Als erstes sollten geeignete Lösemittel für die Acylierungsreaktion gefunden werden.

Die eingesetzten nativen Glycolipide besitzen in ihrer Eigenschaft als Tenside unterschiedliche Löslichkeiten in verschiedenen Lösemitteln. Als erstes Entscheidungskriterium sollte daher die Löslichkeit im organischen Lösungsmittel im Verhältnis zur Löslichkeit in Wasser herangezogen werden. Ausgehend von den Ergebnissen in Kapitel 3.6.1 wurden dazu die Löslichkeiten der Glycolipide in 7 organischen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität untersucht, wobei 5 mg des jeweiligen Glycolipids in 5 ml Lösungsmittel vorgelegt wurden.

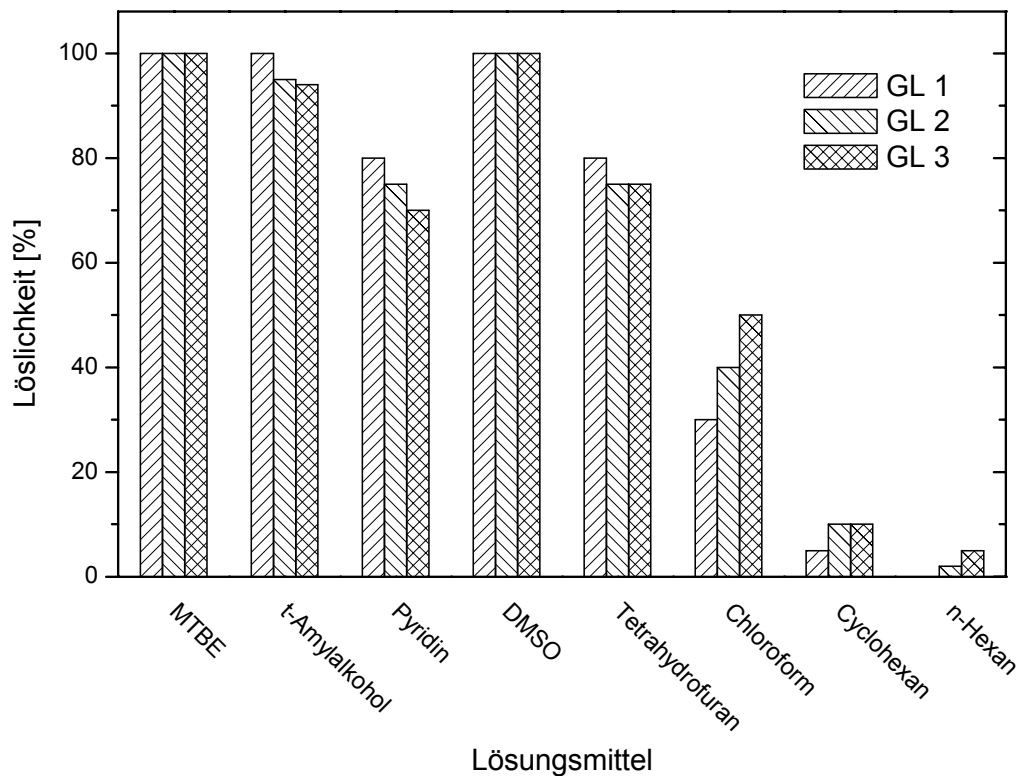


Abbildung 3.28: Löslichkeit der Glycolipide in Abhängigkeit vom Lösungsmittel.
Bedingungen: 5 mg Glycolipid in 5 ml Lösungsmittel; Inkubationszeit: 3h;
Inkubationstemperatur: 55 °C

Abbildung 3.28 zeigt die Ergebnisse der Löslichkeitsversuche. In MTBE und DMSO wurden alle Glycolipide vollständig gelöst; t-Amylalkohol, Pyridin und Tetrahydrofuran zeigen ebenfalls noch gute Löslichkeiten. Auf die Verwendung von DMSO wurde im weiteren aber verzichtet, da es sich bei der anschließenden Aufarbeitung schwer abtrennen ließ.

Anschließend wurden in den vier oben ausgewählten Lösungsmitteln verschiedene Lipasen auf ihre Eignung für die enzymatische Acylierung der Glycolipide mit einer bestimmten Fettsäure (Ölsäure) untersucht. Die Ansätze wurden gemäß Abschnitt 2.6.2 durchgeführt. Nach 48 h wurden die Umsetzungen gestoppt, Proben entnommen und diese mittels Dünnschichtchromatographie ausgewertet.

Tabelle 3.23: Umsetzung der Glycolipide mit Ölsäure in verschiedenen Lösungsmitteln und verschiedenen Lipasen.

Bedingungen: 2 ml Eppendorfgefäße, 1,5 ml Lösungsmittel, 5 mg Enzym, 10 mg Ölsäure, 2mg Glycolipid, aktiviertes Molsieb, T=55 °C, 100 Upm, 48 h
Lösungsmittel: 1) MTBE, 2) t-Amylalkohol, 3) Pyridin, 4) Tetrahydrofuran

Lipase	GL 1				GL 2				GL 3			
	Lösungsmittel:				Lösungsmittel:				Lösungsmittel:			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Lipozyme 60	++	+	-	-	++	+	-	-	++	++	-	-
Novozyme 435	++	+	+/-	-	++	++	+/	-	++	++	+/-	-
Lipase <i>C. cylindracea</i>	+	+/-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Lipase <i>C. antarctica</i>	+	+/-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-

Umsetzung: ++ sehr stark, +stark, +/- schwach, - keine

In Tabelle 3.23 sind die Ergebnisse der Umsetzungen dargestellt. In keinem der Ansätze wurde nach 48h eine vollständige Umsetzung zu einem neuen Acylierungsprodukt gefunden. In MTBE zeigte sich für alle Glycolipide und alle getesteten Enzymen eine starke bis sehr starke Umsetzung. Auch in t-Amylalkohol waren gute Umsetzungen zu finden, wenn auch etwas schwächer als bei MTBE. In Pyridin konnte nur sehr wenig neues Umsetzungsprodukt identifiziert werden und Tetrahydrofuran schied gänzlich als Lösungsmittel für die enzymatische Acylierung aus.

Außerdem zeigte sich, dass die beiden immobilisierten technischen Enzyme Novozyme 435 und Lipozyme 60 die größte Aktivität in dem gewählten System aufwiesen. Auch auf Grund der vereinfachten Aufarbeitung bei der Verwendung von immobilisierten Enzymen fanden in weiteren Untersuchungen diese beiden Enzyme überwiegend Anwendung.

In den folgenden Untersuchungen sollte das Substratspektrum der enzymatischen Acylierung in den beiden gewählten Lösungsmitteln (MTBE, t-Amylalkohol) mit dem aktivsten Enzym (Novozyme 435) ermittelt werden. Die Untersuchung wurde hauptsächlich mit den beiden Glycolipiden GL 2 und GL 3 durchgeführt.

Tabelle 3.24 gibt die Ergebnisse der Acylierungsversuche an GL 2 und GL 3 wieder. Bis auf die Dicarbonsäure (trans-3-Hexendisäure) werden in MTBE alle eingesetzten Fettsäuren mit beiden Glycolipiden umgesetzt. In t-Amylalkohol war dagegen in den meisten Fällen nur eine schwache oder keine Umsetzung zu beobachten.

Tabelle 3.24: Versuch mit Novozyme 435 und unterschiedlichen Fettsäuren

Bedingungen: 2 ml Eppendorfgefäße, 1,5 ml Lösungsmittel, 5 mg Enzym, 10 mg Fettsäure, aktiviertes Molsieb, T=55 °C, 100 Upm, 48 h

Fettsäure	GL 2		GL 3	
	MTBE	t-Amylalkohol	MTBE	t-Amylalkohol
Linolsäure	+	-	+	-
Linolensäure	+	-	+	-
Ölsäure	++	+	++	+
Behensäure	++	+/-	++	+/-
Cyclohexansäure	++	+/-	++	+/-
4-Pentensäure	++	-	++	-
10-Undecensäure	++	+	++	+
4-Pentinsäure	++	+/-	++	+/-
5-Bromvaleriansäure	+	-	+	-
3-Brompropionsäure	+	-	+	-
2-Brompropionsäure	+	-	+	-
Laurinsäure	++	-	++	-
trans-2-Pentensäure	+	+/-	+	+/-
trans-3-Hexendisäure	-	-	-	-

Umsetzung: ++ sehr stark, +stark, +/- schwach, - keine

In Abbildung 3.29 ist ein Dünnschichtchromatogramm von einigen der oben genannten Umsetzungen dargestellt. Es zeigte sich ein nicht einheitliches Produktspektrum bei den eingesetzten Fettsäuren. Einige Ansätze lieferten nur ein neues Umsetzungsprodukt, andere dagegen bis zu deren vier.

In keinem der untersuchten Fälle ist eine vollständige Umsetzung der nativen Glycolipide zu einem neuen Produkt zu finden. Auch bei einer Verlängerung der Reaktionszeit auf bis zu 96 h war das gleiche Produkt/Edukt-Verhältnis zu beobachten.

Da das Zuckergrundgerüst von GL 1 Trehalose darstellt und die Acylierung von Disacchariden in der Literatur häufig beschrieben ist, wurde dies hier nicht im Detail untersucht. Abbildung 3.30 zeigt ein Beispiel für dessen erfolgreiche Umsetzung mit Ölsäure und Behensäure.

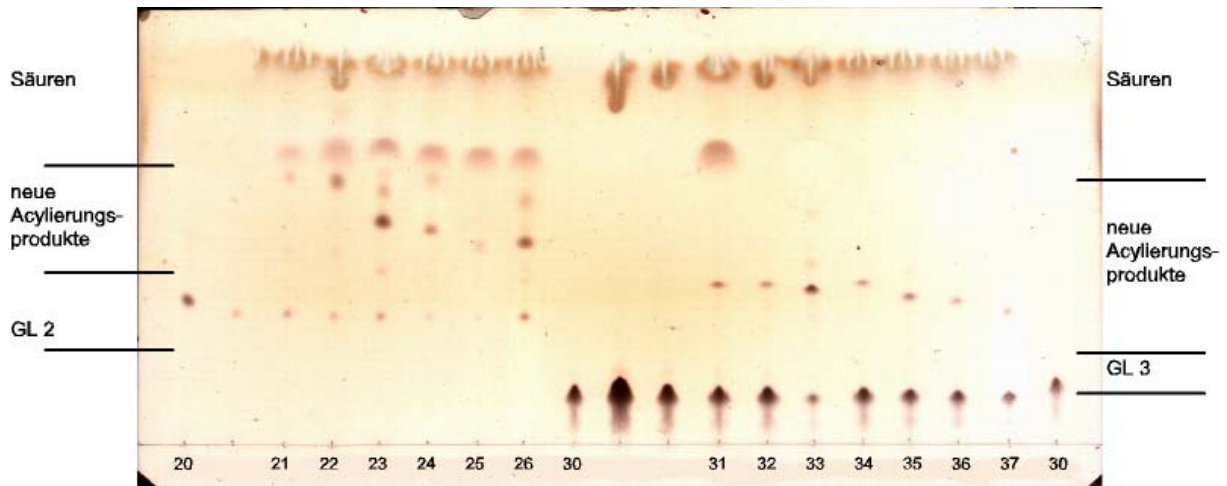


Abbildung 3.29: DC einer Acylierung: in MTBE nach 48 h

Bahnen:

20-26: GL 2 mit/ohne Säuren

20: ohne Fettsäure, 21: Behensäure, 22: Cyclohexensäure,
23: 5-Bromvaleriansäure, 24: 3-Brompropionsäure,
25: 2-Brompropionsäure

30-37: GL 3 mit/ohne Säuren

31: Ölsäure, 32: Stearinsäure, 33: Laurinsäure,
34: Behensäure, 35: Cyclohexansäure, 36: 5-Bromvaleriansäure,
37: 2-Brompropionsäure

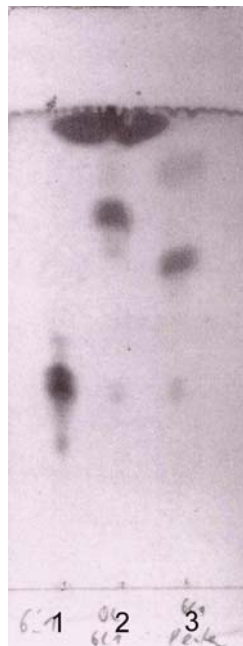


Abbildung 3.30: DC einer Acylierungsreaktion von GL 1

Bedingungen: - Lösungsmittel MTBE

- Enzym: Novozyme 435

1: GL 1

2: GL 1 + Enzym + Ölsäure

3: GL 1 + Enzym + Behensäure

Darstellung eines neuen Glycolipids aus GL 3 und Ölsäure

Zur genaueren Untersuchung einer Acylierungsreaktion, zur Optimierung und zur Identifizierung der neu gebildeten Glycolipide wurde das Modellsystem GL 3 + Ölsäure in MTBE und Novozyme 435 gewählt, welches in den Voruntersuchungen eine starke Umsetzungsreaktion gezeigt hatte.

Abbildung 3.31 zeigt eine Dünnschichtchromatographie der genannten Umsetzung (nach der unten beschriebenen Optimierung). Bei den R_F -Werten 0.57 und 0.73 sind zwei Acylierungsprodukte zu erkennen (GL 3-Ölsäure 1, GL 3-Ölsäure 2). Das Produkt/Eduktverhältnis lag vor der Optimierung unter den Bedingungen der Voruntersuchungen bei etwa 80/15/4 (GL 3/ GL 3-Ölsäure 1/GL 3-Ölsäure 2) und somit weit auf der Seite des Eduktes; nach der Optimierung bei 5/80/15.

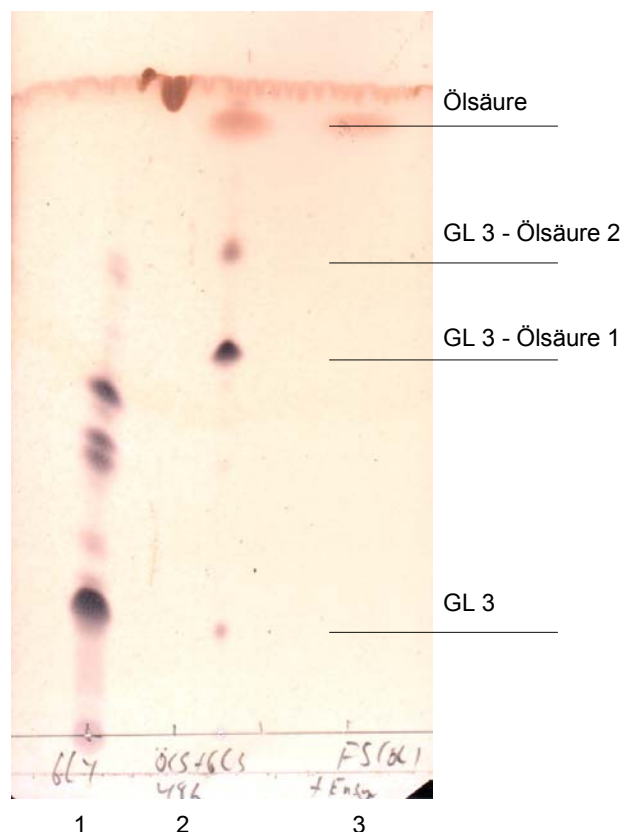


Abbildung 3.31: DC nach Acylierung von GL3 mit Ölsäure (nach der Optimierung).
 1) Glycolipidgemisch (GL 1+GL 2+ GL 3); 2) Umsetzungsreaktion GL 3 und Ölsäure; 3) Ölsäure.
 Laufmittel: Chloroform/Methanol Wasser (65/15/2)

Zur ersten Validierung der Versuchsergebnisse sollte untersucht werden, ob die beiden neu gefundenen Produkte wirklich von der Lipase in Verbindung mit der freien Ölsäure gebildet wurden. Damit sollten etwaige autokatalytische Reaktionen

ausgeschlossen werden. Dazu wurden Blindansätze mit GL 3 und Ölsäure in MTBE ohne Enzym, mit GL 3 und Enzym aber ohne Ölsäure als auch nur die freie Ölsäure in MTBE und Enzym beobachtet. Bei keinem dieser Ansätze konnten neue Produkte gefunden werden. Somit konnte zum einen eine mögliche intermolekulare Lactonbildung am Glycolipid GL 3, eine Autohydrolyse oder Umesterung am GL 3 als auch unspezifische Anlagerungen der freien Fettsäure an das GL 3 als möglicher Reaktionsweg der neuen Produkte ausgeschlossen werden. Basierend auf diesem Hintergrund konnte angenommen werden, dass es sich bei GL 3-Ölsäure1 und GL 3-Ölsäure2 um Acylierungsprodukte handelt.

a) Einfluss des Wassergehalts auf die Produktbildung

Ein wichtiger Aspekt der enzymatischen Acylierung durch Lipasen im organischen Lösungsmittel stellt die Wasseraktivität a_w des gesamten Reaktionssystems dar. Wie in der Literatur ausgeführt, ist ein ganz bestimmter Wassergehalt für eine optimale Umsetzung notwendig [ZAKS and KLIBANOV, 1988]. In der folgenden Versuchsreihe sollte deshalb der Einfluss des Wassergehalts auf die Acylierungsreaktion näher untersucht werden.

Die Ergebnisse in Abhängigkeit vom Wasserzusatz sind in Abbildung 3.32 zu sehen. Dabei kommt es bei den gewählten Wassergehalt aufgrund der relativ guten Löslichkeit von Wasser in MTBE (25 g l^{-1}) zu keiner Zweiphasenbildung. Die prozentualen Angaben der Wassermenge beziehen sich nur auf die zugesetzte Wassermenge in Relation zur Solventmenge. Nicht einbezogen ist der Wassergehalt des Immobilisats, der laut Hersteller bei 1 % (w/w) liegt. Ebenso wenig ist das Wasser im Lösungsmittel berücksichtigt, das beim verwendeten MTBE gemäß Herstellerangabe unter 0.01 % liegt. Durch Trocknung mittels NaSO_4 und Lagerung auf aktiviertem Molsieb sollte der Wassergehalt des Lösungsmittels noch geringer ausfallen und damit ohne größere Bedeutung sein.

Es ist zu erkennen, dass mit steigendem Wassergehalt die Produktausbeute drastisch sinkt und bei einer Zugabe von 0.5 % Wasser keine Produktbildung mehr zu erkennen ist. Das Verhältnis von gebildeten Produkten GL 3-Ölsäure1 zu GL 3-Ölsäure2 bleibt dagegen mit etwa 5/1 nahezu identisch.

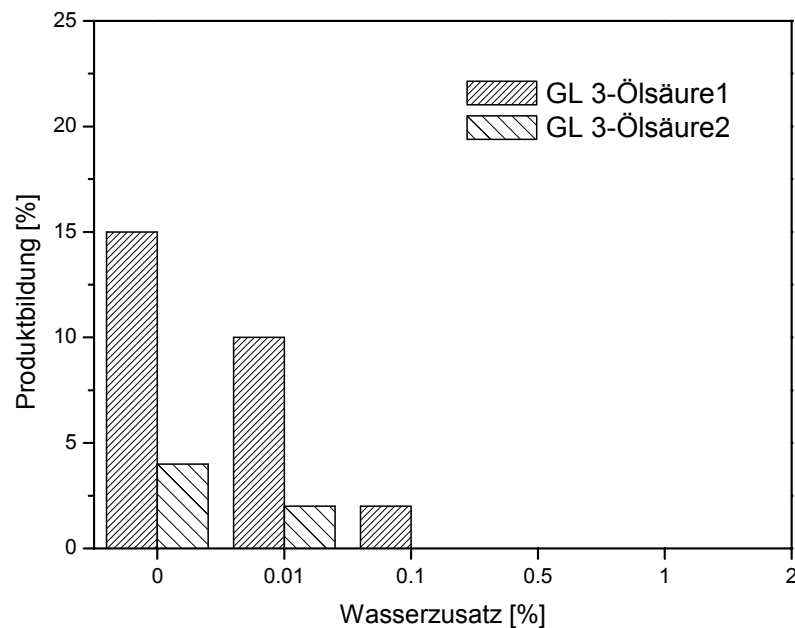


Abbildung 3.32: Produktbildung in Abhängigkeit von der zugesetzten Wassermenge.
Bedingungen entsprechend Standardansatz (2 ml Eppendorfgefäß, 1.5 ml Lösungsmittel, 5 mg Enzym, 10 mg Fettsäure, T=55°C, 100 Upm, 48 h).

Um den Wassergehalt im Versuchsansatz noch weiter zu optimieren, wurde bei folgenden Untersuchungen Molsieb zugesetzt, um selbst das Wasser, das bei der Esterbildung entsteht, zu binden. In Abbildung 3.33 ist die Produktbildung in Abhängigkeit von der eingesetzten Molsiebmenge dargestellt. Man erkennt eine maximale Produktbildung von 95% bei der Zugabe von 40 mg ml^{-1} Molsieb zu dem Versuchsansatz. Eine weitere Steigerung der Molsiebkonzentration verringert dagegen wieder die Produktausbeute. Bei weiteren Untersuchungen wurde auf Grund dieses Ergebnisses immer die ermittelte optimale Menge an aktiviertem Molsieb (40 mg ml^{-1}) dem Testansatz beigelegt.

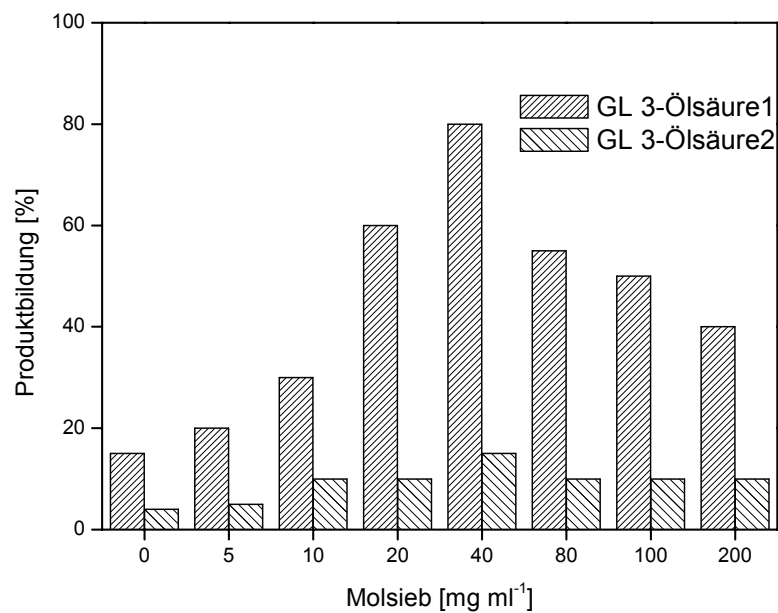


Abbildung 3.33: Produktbildung in Abhängigkeit vom Molsieb.
Bedingungen entsprechend Standardansatz (Abbildung 3.32).

b) Einfluss der Temperatur auf die Produktbildung

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Produktsteigerung war die Optimierung der Temperatur. Unter den bekannten Versuchsbedingungen wurde das Reaktionsgleichgewicht der enzymatischen Acylierung von GL 3 mit Ölsäure bei verschiedenen Temperaturen beobachtet. Die Produktausbeute in Abhängigkeit von der Versuchstemperatur nach 48h ist in Abbildung 3.34 dargestellt. Man erkennt das Produktionsoptimum bei 55 °C mit 95 % Umsetzung und dem Verhältnis von 5/1 (GL 3-Ölsäure1/GL 3-Ölsäure2). Abweichend von dieser Reaktionstemperatur fällt die Produktbildung ab und die Produktverhältnisse ändern sich deutlich. So findet man bei niedrigeren Temperaturen eine Verschiebung hin zum GL 3-Ölsäure2 und bei höheren Temperaturen zu GL 3-Ölsäure1.

Abbildung 3.31 gibt die Umsetzung von GL 3 und Ölsäure mit den optimierten Parametern wieder.

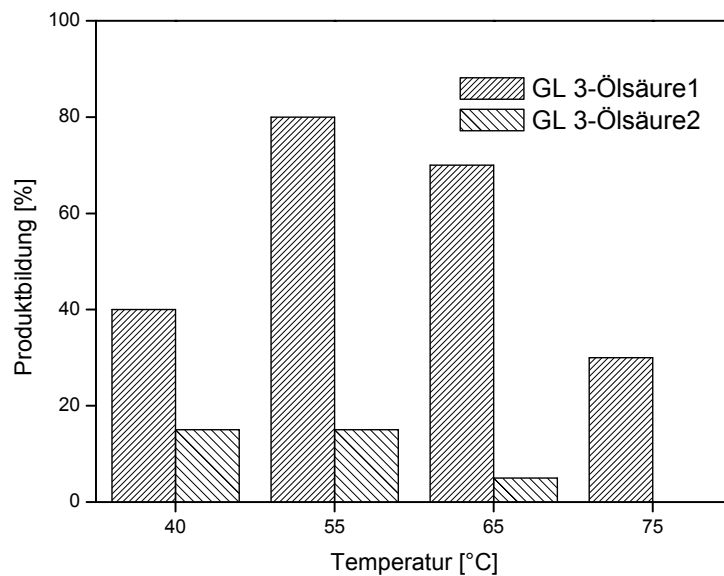


Abbildung 3.34: Produktbildung in Abhängigkeit von der Temperatur. Bedingungen entsprechend Standardansatz (Abbildung 3.32).

c) Isolierung der neuen Produkte

Sowohl zur Identifizierung von GL 3-Ölsäure1 und GL 3-Ölsäure2 als auch für die Verwendung der neuen Glycolipide für physikochemische und biologische Untersuchungen mussten die Produkte zuerst isoliert werden. Dabei traten unerwartet Probleme in Bezug auf die Stabilität der neuen Glycolipide auf. Bei ersten Aufarbeitungsversuchen zerfielen die Produkte, sodass nach mehreren Extraktions- und Chromatographieschritten jeweils nur noch die Ausgangsprodukte GL 3 und Ölsäure identifizierbar waren.

In Abbildung 3.35 sind die unterschiedlichen Aufarbeitungsschritte dargestellt. Die Abtrennung des Molsiebs und des Enzyms erfolgte durch Filtration. Das anschließende Einrotieren des MTBE-Gemisches und die folgende Extraktion mit MeOH/n-Hexan zur Beseitigung der Ölsäure konnte ohne wesentliche Produktverluste durchgeführt werden. Eine Trennung der Glycolipide durch Dickschichtchromatographie scheiterte sowohl bei der Verwendung von wasserhaltigen als auch bei wasserfreien Laufmittelgemischen. Anscheinend hatte die Kombination Kieselgel/Wasser einen erheblichen negativen Einfluss auf die Stabilität der Verbindungen.

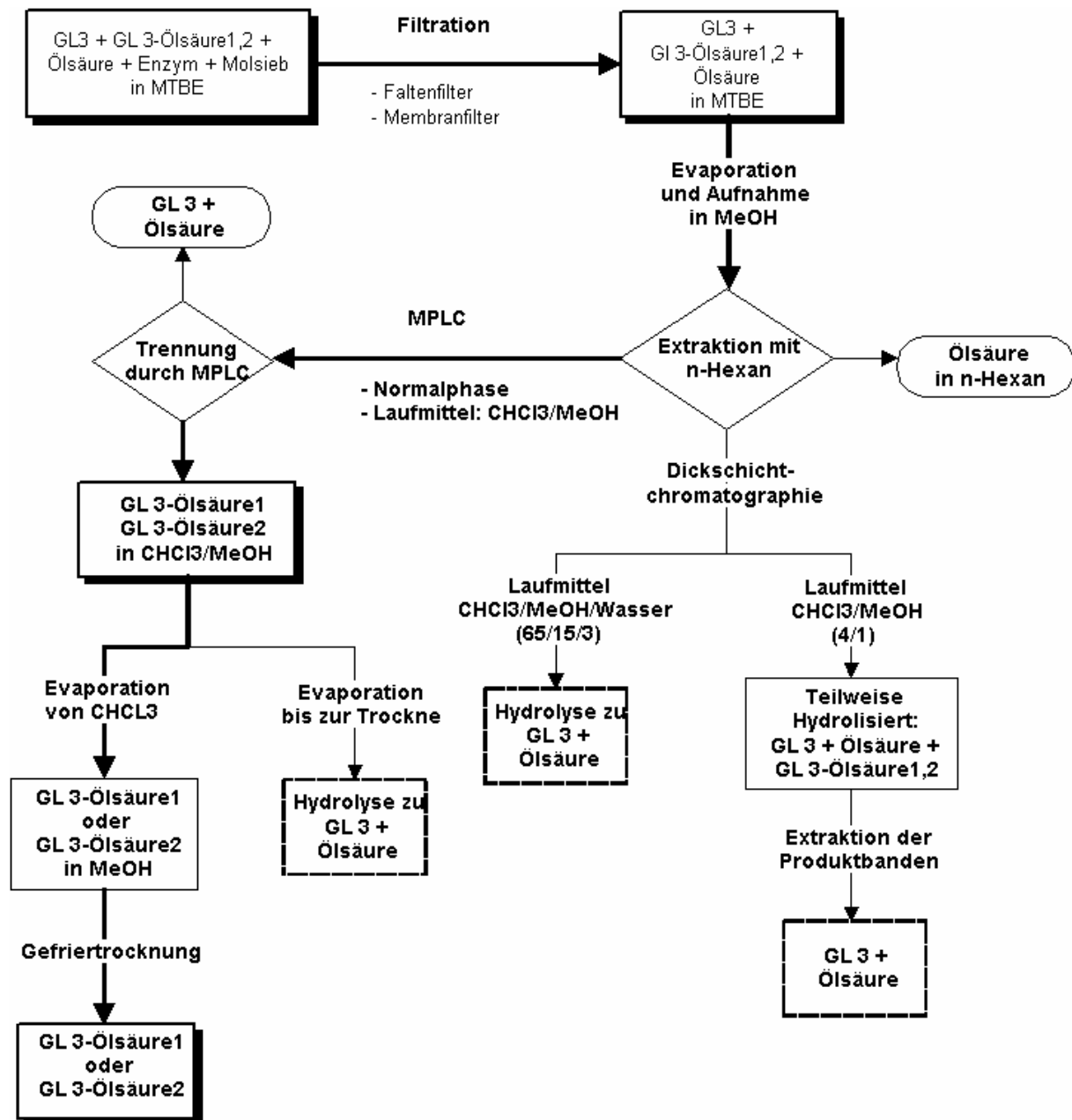


Abbildung 3.35: Aufarbeitungsschema zur Gewinnung von GL 3-Ölsäure1 und GL 3-Ölsäure2

Die Trennung mittels MPLC unter Verwendung von wasserfreiem Laufmittel (MeOH/Chloroform) hatte keine Hydrolyse der neuen Glycolipide in die Ausgangsprodukte zur Folge. Durch diesen Chromatographieschritt konnten die Edukte sowie die beiden Produkte voneinander getrennt werden. Bei der anschließenden einfachen Entfernung des Lösungsmittels durch Evaporation bis zur Trockne zerfielen die Produkte GL 3-Ölsäure1 und GL 3-Ölsäure2 aber wieder. Wurde dagegen die Entfernung des Lösungsmittelgemisches Chloroform/Methanol nur bis zur Verdampfung des Chloroforms vorangetrieben und das Methanol anschließend in der Kälte mittels Gefriertrocknung abgezogen, so konnten

chromatographisch nur GL 3-Ölsäure¹ und GL 3-Ölsäure² identifiziert werden. Die geringe Ausbeute von etwa 15% war durch die Instabilität der Produkte und durch Extraktionsverluste zu erklären.

Die beobachteten Stabilitätsprobleme der neuen Glycolipide führten auch zu Schwierigkeiten bei der Strukturanalyse mittels NMR und MS. So konnte kein Massenspektrum von GL 3-Ölsäure¹ und GL 3-Ölsäure² aufgenommen werden. Zwar wurden die Molekülonen von GL 3 und freier Ölsäure identifiziert aber keine von den acylierten GL 3-Molekülen.

Die Tabellen 6.9 und 6.11 (Anhang) enthalten die gemessenen ¹H-NMR-Daten von GL 3-Ölsäure¹ und dessen Acylsubstituenten. Zur Interpretation und zum Vergleich mit den nativen Glycolipiden sind auch deren NMR-Daten im Anhang aufgeführt. Man erkennt zwischen den Spektren des nativen GL 3 und des zusätzlich acylierten einen Shift der drei Protonen H-5, H-6A und H-6B in der Galactoseuntereinheit (Zucker D). Insbesondere die Verschiebung der H-6-Protonen von 3.67 ppm zu 4.28 ppm weist auf eine zusätzliche Acylierung an der primären OH-Gruppe der Galactoseuntereinheit hin. Weitere Verschiebungen, vor allem bei den H-6-Protonen des Zucker C (Glucoseuntereinheit mit primärer OH-Gruppe; zweite Acylierung bei GL 3-Ölsäure 2) konnten nicht beobachtet werden. Somit handelt es sich bei GL 3-Ölsäure 1 um ein fünffach-acyliertes Glycolipid (siehe Abbildung 3.36). Die für cis-Doppelbindungen charakteristischen Spektren des CH₂CH= -Proton bei 5.37 ppm und des CH₂CH= -Proton bei 2.05 ppm zeigen, dass es sich bei dem zusätzlichen Acylrest um die 18:1 Ölsäure handelt.

Die ¹H-NMR-Untersuchungen von GL 3-Ölsäure² lieferten dagegen kein eindeutiges Spektrum in Bezug auf eine weitere Acylierung der zweiten primären OH-Gruppe (am Zucker C). Das Spektrum ist mit dem von GL 3-Ölsäure¹ identisch, zeigt jedoch im Gegensatz zu dem fünffach-acylierten Glycolipid die Anwesenheit von freier ungebundener Fettsäure. Auf Grund der unterschiedlichen R_f-Werte der beiden Glycolipide (GL 3-Ölsäure² ist unpolarer als GL 3-Ölsäure¹) und der Identifizierung von freier Fettsäure bei der NMR-Messung (nach der Aufreinigung mittels MPLC war keine freie Fettsäure detektierbar), ist davon auszugehen, dass GL 3-Ölsäure² sechsfach-acyliert ist (wie in Abbildung 3.36 dargestellt), die Acylverbindung an der primären OH-Gruppe des Zucker C aber sehr instabil ist.

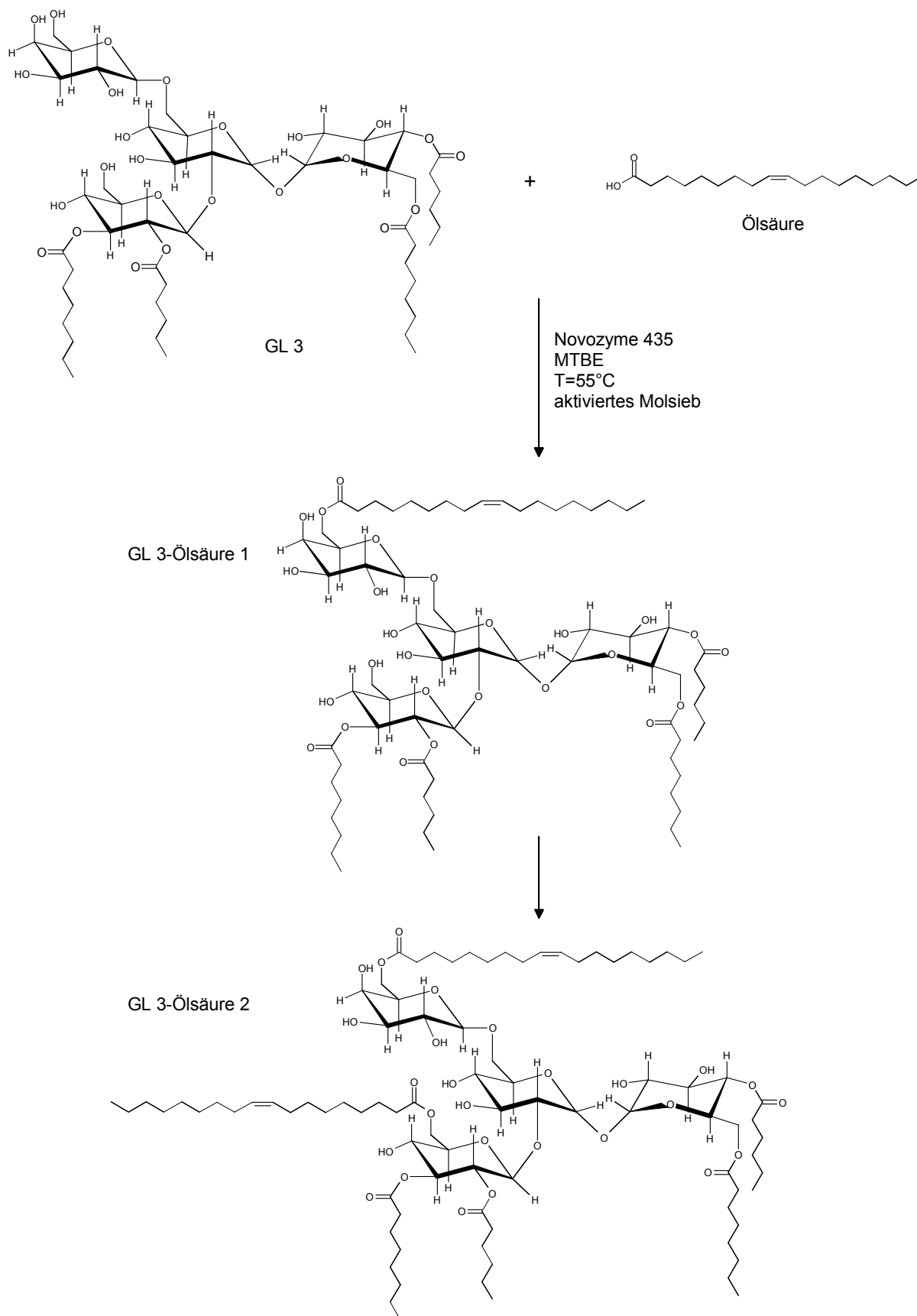


Abbildung 3.36: Reaktionsschema der Acylierungsreaktion von GL 3 mittels Novozyme 435 und Ölsäure.

Das Reaktionsschema der Acylierung von GL 3 mit Ölsäure entspricht somit dem in Abbildung 3.36 dargestellten. GL 3 wird an seinen beiden primären OH-Gruppen durch die Lipase acyliert und es sind nur ein fünffach- und ein sechsfach-acyliertes Produkt identifizierbar.

Es wurden auch andere Acylierungsprodukte isoliert. So zum Beispiel das bei der Beschreibung der physikochemischen Eigenschaften untersuchte GL 3-Pentensäure¹. Es entspricht in seiner angenommenen Struktur dem GL 3-Ölsäure¹, besitzt aber statt der acylierten Ölsäure eine Pentensäure. Die Herstellung und Isolierung erfolgte entsprechend dem GL 3-Ölsäure¹. Die Bildung eines zweiten Acylierungsproduktes (GL 3-Pentensäure²) konnte ebenfalls beobachtet werden. Eine Strukturaufklärung dieser Substanzen wurde jedoch nicht durchgeführt.

3.5.4 Enzymatische Acylierung der Zuckergrundgerüste

Die Schwierigkeiten, Mono-, Di- bzw. Oligosaccharide mit Hilfe von Lipasen (oder Proteasen) zu acylieren, sind in der Literatur hinreichend beschrieben. Im vorliegenden Fall sollten nun die Kohlenhydratgrundgerüste der nativen Glycolipide GL 1-3 funktionalisiert werden. Da das G 1 (Zuckergrundgerüst von GL 1) Trehalose darstellt und die Synthese von Glycolipiden aus gewöhnlichen Disacchariden [WOUDENBERG-VAN OOSTERDOM et al., 1996] gut dokumentiert ist, wurde auf Untersuchungen mit G 1 verzichtet. Die folgenden Versuche bezogen sich deshalb im Wesentlichen auf die Darstellung neuer Glycolipide aus dem ungewöhnlichen Tetrasaccharid G 3 (Zuckergrundgerüst von GL 3).

3.5.4.1 Untersuchungen zur enzymatischen Acylierung

Ebenso wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben, sollte hier mittels Lipasen in organischen Lösungsmitteln eine Acylierung der Hydroxylgruppen (bevorzugt der primären OH-Gruppen) der Zuckereinheiten in Verbindung mit angebotenen Acylsubstituenten (freie Fettsäuren) durchgeführt werden.

Löslichkeitsuntersuchungen

Ein Hauptproblem stellte dabei die geringe Löslichkeit der Zuckersubstrate in organischen Lösungsmitteln dar. Deshalb wurden zuerst Lösungsversuche mit G 3 in unterschiedlichen Lösungsmitteln durchgeführt.

Tabelle 3.25 gibt die Ergebnisse wieder. Wie erwartet, ist, auf Grund der polareren Eigenschaften des Tetrasaccharides im Gegensatz zu den in der Literatur verwendeten Mono- oder Disacchariden [LJUNGER et al., 1994; KU AND HANG, 1995; THERISOD AND KLIBANOV, 1986] nur eine geringe Löslichkeit in den verwendeten Lösungsmitteln zu beobachten. Lediglich in Pyridin und DMSO konnte G 3 zu ca. 10% gelöst werden. Nachfolgende Acylierungsversuche mit G 3 wurden deshalb in diesen beiden Lösungsmitteln durchgeführt.

Folgende Bedingungen wurden gewählt:

- 2 ml Eppendorfgefäß, 1.5 ml Lösungsmittel(Pyridin, DMSO), 2 mg G 3, 5 mg Novozyme 435, 10 mg Fettsäure, aktiviertes Molsieb, T=55°C, 100 Upm, 48h
- Fettsäuren: Ölsäure, 4-Pentensäure, 10-Undecensäure

Unter keinen der gewählten Bedingungen konnte eine Synthese von Glycolipiden beobachtet werden, was vermutlich an den sehr niedrigen Log P-Werten der Lösungsmittel lag.

Tabelle 3.25: Lösungsversuche von G 3 in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Konzentration 2g/l; Inkubationszeit 24h, 100 Upm. Löslichkeit in Wasser [100%].

Lösungsmittel	Temperatur [°C]	Log <i>P</i>	Löslichkeit [%]
tert- Amylalkohol	60	+1.30	0
Pyridin	60	-0.71	10
Tetrahydrofuran	60	+0.49	0
MTBE	37	+1.14	0
Aceton	37	-0.23	0
Ethylacetat	60	+0.84	0
Acetonitril	60	-0.33	0
DMSO	60	-1.30	10

Verbesserung der Löslichkeit von G 3 in organischen Lösungsmittel durch Phenylborsäure

In Abschnitt 3.5.3 wurde gezeigt, dass in MTBE oder t-Amylalkohol eine Acylierung der nativen Glycolipide erfolgreich war. Deshalb wurden auch hier diese beiden Lösungsmittel getestet. Allerdings war es zunächst nötig, die Löslichkeit von G 3 zu verbessern. Aus diesem Grund wurde die Verwendung von Phenylborsäure als Lösungsvermittler untersucht. Diese Säure ist in der Zuckerchemie als Agens zur Solubilisierung und zum Schutz bestimmter Hydroxygruppen bekannt [WOLFROM and SOLMS, 1956; FERRIER, 1961; FERRIER et al., 1964, FERRIER and PRASAD, 1965; PARK and LEE, 1992, SCHLOTTERBECK et al., 1993, OGUNTMEIN et al., 1993].

Es ist zwischen zwei Strategien bei der Acylierung mittels Phenylborsäure zu wählen [STEFFEN et al., 1994]. Der Unterschied besteht darin, ob das Substrat (Zucker) vor der Umsetzung mit dem Enzym mit der Phenylborsäure vorinkubiert wird, damit es zur Bildung von zyklischen Estern und damit zur Lösung im organischen Lösungsmittel kommt, oder, ob alles in einem „Eintopf-Verfahren“ zusammen mit dem Enzym im Reaktionsgefäß vorgelegt wird. Bei den hier vorgestellten Untersuchungen in 2 ml Ansätzen kam das „Eintopf-Verfahren“ zum Einsatz, bei dem das Verhältnis von Phenylborsäure und G 3 variiert wurde.

Tabelle 3.26: Enzymatische Acylierungsversuche von G 3 in organischen Lösungsmittel in Phenylborsäure-Gegenwart.
2 ml Lösungsmittel, 2.5 mg l⁻¹ Novozyme 435, 4 mg ml⁻¹ G 3, 2-18 mmol l⁻¹ Phenylborsäure, 2 mg ml⁻¹ Ölsäure, T=55°C, aktiviertes Molsieb, 100 Upm.

Molares Verhältnis Phenylborsäure/G 3	MTBE		t-Amylalkohol	
	Löslichkeit	Umsetzung	Löslichkeit	Umsetzung
0.3:1	0	-	1 %	-
0.5:1	0	-	2 %	-
1:1	0	-	4 %	-
2:1	0	-	6 %	-
3:1	0	-	8 %	-

Tabelle 3.26 zeigt, dass in MTBE keine Steigerung der Löslichkeit mit Phenylborsäure erreicht werden konnte. Bei t-Amylalkohol nimmt zwar mit steigendem Phenylborsäure/G3-Verhältnis die Löslichkeit von G 3 zu und konnte von 0% auf 8% gesteigert werden. Trotzdem wurden aber keine neuen Produkte identifiziert; eine Acylierung von G 3 war demnach nicht erfolgt.

Lösungsmittelgemische

Neben den zuvor beschriebenen Strategien, Schutzgruppenchemie an den Substraten auszuführen und reine Lösungsmittel zu verwenden, sollte man auch austesten, Gemische von Lösungsmitteln zu verwenden [PLOU et al., 2002; DEGN and ZIMMERMANN, 2001; FERRER et al., 1999; MUTUA and AKOH, 1993]. Die eigenen Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass die Lösungsmittel MTBE und t-Amylalkohol für das Enzymsystem gut geeignet sind und die Fettsäurekomponente gut in ihnen löslich ist. Die Löslichkeit des Zuckers G 3 war dagegen nur in Pyridin und DMSO relativ gut. Die folgenden Untersuchungen sollten nun zeigen, ob eine Kombination dieser Lösungsmittel eine enzymatische Umsetzung ermöglicht.

In Tabelle 3.27 sind die Ergebnisse aufgeführt. Die Löslichkeit bezieht sich auf das gelöste G 3 im Lösungsmittelgemisch im Verhältnis zur Löslichkeit in Wasser (100%). Die Menge an gelöstem G 3 bleibt dabei über den gesamten Beobachtungszeitraum (48h) annähernd gleich, da das G 3 entsprechend der Umsetzung nachgelöst wird. In beiden gewählten Systemen ist die Produktion von neuen Produkten zu beobachten. Dabei weist das MTBE:Pyridin-Gemisch eine höhere Umsetzung auf. Wie zu erwarten, steigt zunächst mit zunehmendem Pyridingehalt die Menge an gelöstem G 3 und damit auch die Menge an neu gebildetem Produkt. Bei einem Pyridingehalt über 50% ist dagegen eine Abnahme der Produktbildung zu beobachten. Somit ist nicht nur die gute Löslichkeit des Substrates, sondern auch die Inaktivierung des Enzyms durch Pyridin bzw. die Stabilisierung durch MTBE oder t-Amylalkohol bei der Wahl der Lösungsmittelzusammensetzung zu beachten. Degn und Zimmermann [2001] beschreiben ein ähnliches Verhalten bei der Verwendung von Aceton:DMSO-Gemischen.

Tabelle 3.27: Enzymatische Acylierung von G 3 in Lösungsmittelgemischen
 2.5 mg l⁻¹ Novozyme 435, 2 mg ml⁻¹ G 3, 2 mg ml⁻¹ Ölsäure, T=55°C, aktiviertes
 Molsieb, 100 Upm, 48 h.

Lösungsmittel	G 3-Löslichkeit	Umsetzung
MTBE:Pyridin (9:1)	5%	-/+
MTBE:Pyridin (7.5:2.5)	5%	+
MTBE:Pyridin (1:1)	10%	++
MTBE:Pyridin (1:9)	10%	-
t-Amylalkohol:Pyridin (9:1)	5%	-
t-Amylalkohol:Pyridin (7.5:2.5)	5%	-/+
t-Amylalkohol:Pyridin (1:1)	10%	+
t-Amylalkohol:Pyridin (1:9)	10%	-

3.5.4.2 Darstellung eines neuen Glycolipids aus G 3 und Ölsäure

Zur Optimierung der Acylierungsreaktion und zur Identifizierung der neu gebildeten Glycolipide wurde das Modellsystem MTBE:Pyridin gewählt.

Synthese und Produktspektrum

Im ersten Schritt sollte das Lösungsmittelverhältnis in Bezug auf die Produktbildung optimiert und der Verlauf der Produktion über die Zeit dokumentiert werden. Die Versuchsbedingungen entsprechen denen der Voruntersuchungen. Ausgehend von einem Gemisch von MTBE:Pyridin (50/50,v/v) wurde die Zusammensetzung in 5%-Schritten geändert und die erhaltene Produktmenge densitometrisch ausgewertet. Nach einer Reaktionszeit von 48 h konnte bei einer Zusammensetzung von MTBE:Pyridin (40:60,v/v) die höchste Produktbildung beobachtet werden.

In Abbildung 3.37 ist das Dünnschichtchromatogramm der Produkte nach der Acylierungsreaktion dargestellt (Edukte bereits abgetrennt). Im Wesentlichen sind drei Hauptkomponenten zu erkennen. Produkt A (G 3-Ölsäure₃) ist am unpolarsten und besitzt einen Produktanteil (nach 48 h) von etwa 10%. Produkt B (G 3-Ölsäure₁) besitzt einen R_F-Wert, der dem des nativen mikrobiellen GL 3 entspricht (Produktanteil nach 48 h: 70 %). Am polarsten ist Produkt C (G 3-Ölsäure₂), das einen R_F-Wert zwischen G 3 und GL 3 besitzt (Produktanteil nach 48 h: 20%).

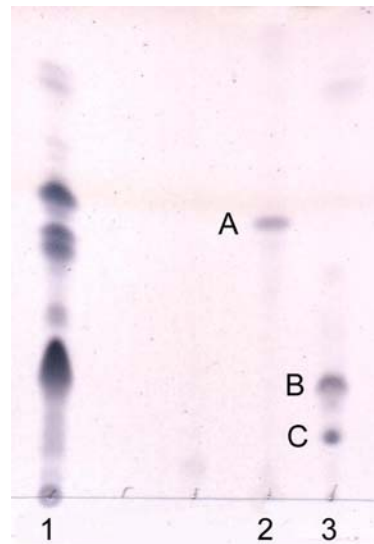


Abbildung 3.37: Dünnschichtchromatogramm der Produktzusammensetzung der G3-Acylierungsreaktion. Normalphase; Laufmittel (Chloroform/Methanol/Wasser, 65/15/2 v/v/v)
 1: natives Glycolipidgemisch (GL 1, GL 2, GL 3); 2+3: Produktfraktionen (A: G 3-Ölsäure3, B: G 3-Ölsäure1, C: G 3-Ölsäure2).

Der Verlauf der Acylierungsreaktion ist in Abbildung 3.38 dargestellt. Als erstes Produkt wird G 3-Ölsäure2 gebildet. Nach etwa 15 h bleibt dessen Konzentration allerdings nahezu konstant. G 3-Ölsäure1 erreicht nach etwa 24 h sein Maximum, zu diesem Zeitpunkt begann die Bildung von G 3-Ölsäure3. Nach etwa 40 h ist keine Konzentrationsänderung mehr zu beobachten und somit scheint ein Gleichgewicht erreicht zu sein.

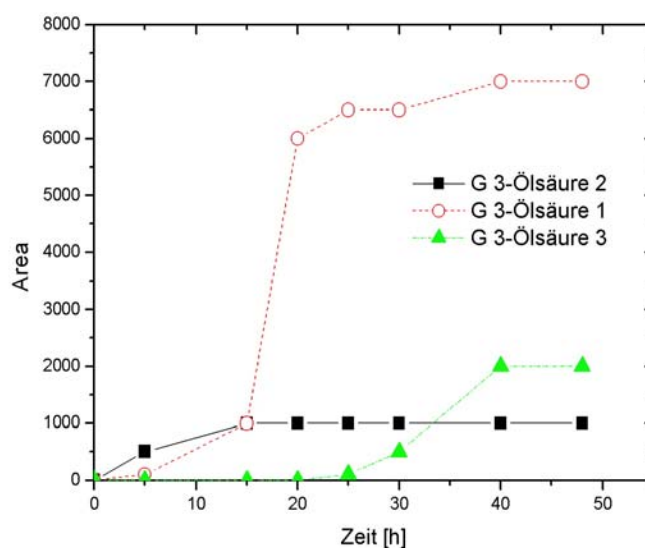


Abbildung 3.38: Zeitlicher Verlauf der Acylierungsreaktion von G 3. Versuchsbedingungen siehe Text. Konzentration der Acylierungsprodukte mittels Densitometrie in Flächeneinheiten [Area].

Aufarbeitung

Die Aufreinigung der neuen Glycolipide gestaltete sich ähnlich schwierig wie unter Abschnitt 3.5.3, da einige der gebildeten Glycolipide keine hohe Stabilität aufwiesen. Die Reaktionsansätze wurden mittels Filtration (Filterpapier und Membranfilter) von den festen Bestandteilen befreit (Enzym, Molsieb, ungelöstes Substrat). Anschließend wurde das Lösungsmittelgemisch mittels Evaporation entfernt. Da die Produkte nicht nur in MTBE sondern auch in Pyridin löslich waren, musste bis zur Trockne einrotiert werden. Nach der Aufnahme in einem Methanol/Chloroform-Gemisch (für die MPLC) konnte in der Produktzusammensetzung kein G 3-Ölsäure³ mehr nachgewiesen werden. Anzunehmen ist ein Zerfall in die Edukte G 3 und Ölsäure oder in eins der anderen Produkte. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels MPLC (Normalphase-Methanol/Chloroform (1/4;v/v) wobei die Edukte und die einzelnen Produkte voneinander getrennt werden konnten. Die Ausbeute von G 3-Ölsäure² war allerdings so gering, dass keine anschließende Identifizierung mittels NMR und MS durchgeführt werden konnte.

Identifizierung

Die ¹H-NMR-Daten von G 3-Ölsäure¹ sind in Tabelle 6.11 (Anhang) dargestellt. Das Spektrum entspricht im Wesentlichen dem des nativen GL3. Dies bedeutet, dass G 3-Ölsäure 1 genau wie GL 3 vierfach substituiert ist und in C-4, C-6, C-2'' und in C-3''-Position den Acylsubstituenten (Ölsäure) trägt. Die für cis-Doppelbindungen charakteristischen Spektren des CH₂CH= -Protons bei 5.37 ppm und der CH₂CH= -Protonen bei 2.05 ppm zeigen, dass es sich bei den Acylresten um die 18:1 Ölsäure handelt.

Erstaunlich bei diesen Daten ist, dass das Zuckergrundgerüst nicht alleine an den primären Hydroxygruppen der 6-Position funktionalisiert wird, so wie es bei den meisten enzymatischen Glycolipidbildungen zu beobachten ist, sondern dass ein Produkt der Acylierungsreaktion genau die Acylierungspositionen aufweist, die vom nativen Glycolipid aus *Tsukamurella* spec. bekannt sind. In der Literatur werden allerdings auch andere Acylierungspositionen als die der primären 6-OH-Positionen beschrieben [PLOU et al., 1999].

Abbildung 3.39 gibt das Schema der Acylierungsreaktion von G 3 zu G 3-Ölsäure1 wieder. Die weiteren Acylierungsprodukte konnten nicht identifiziert werden. Auf Grund der beobachteten R_F -Werte ist allerdings zu vermuten, dass es sich bei G 3-Ölsäure2 um ein Zwischenprodukt handelt, bei dem noch nicht alle 4 Acylierungspositionen besetzt sind. Bei G 3-Ölsäure3 handelt es sich dagegen wohl um ein höher acyliertes Produkt, ähnlich dem GL3-Ölsäure1, bei dem eine oder beide noch freien primären OH-Gruppen funktionalisiert sind. Dies würde auch die geringe Stabilität dieses Produktes erklären, die schon bei den Produkten der GL3-Acylierungsreaktion zu beobachten war.

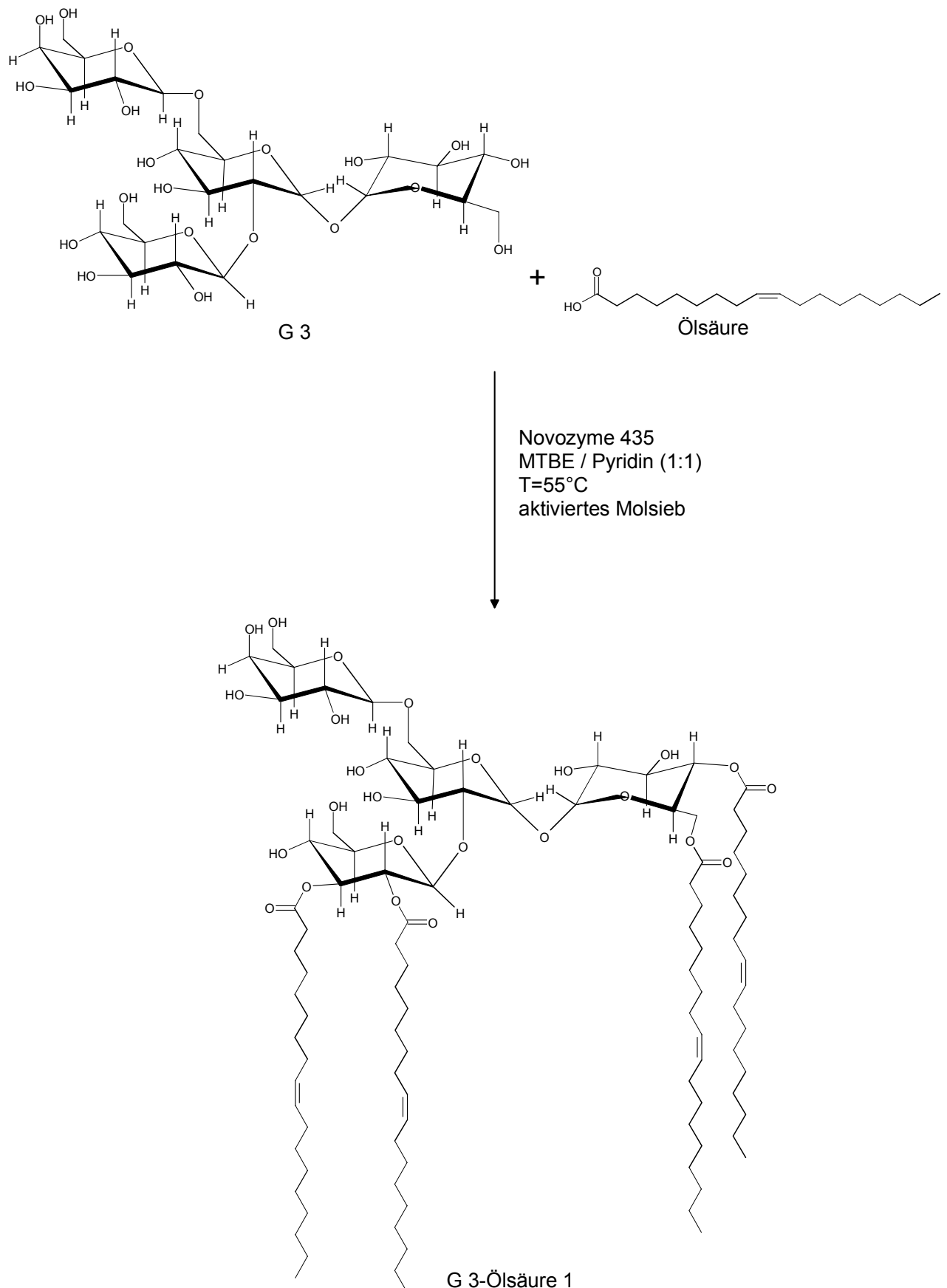


Abbildung 3.39: Schema der Acylierungsreaktion des Zuckergrundgerüsts G 3 mittels Novozyme 435 und Ölsäure.

3.5.5 Spaltung von GL 3 mittels Galactosidasen

In Abschnitt 3.5.2 wurde bei einer Hydrolysereaktion von GL 3 mittels Naringinase auf die Bildung eines Umsetzungsproduktes hingewiesen. Die Naringinase besitzt neben ihren hauptsächlichen L-Rhamnosidase- und Glucosidase-Aktivitäten auch andere Glycosidase-Aktivitäten (SHILVOK, J. P. et al., 1999). Dieses neue Produkt besaß einen R_F -Wert, der dem von GL 2 entsprach. Da auch kein weiteres Produkt zu erkennen war, konnte vermutet werden, dass GL 2 aus dem GL 3 durch Abspaltung der Galactoseeinheit entstanden war. Dieses sollte hier durch den Einsatz von Galactosidasen genauer untersucht werden.

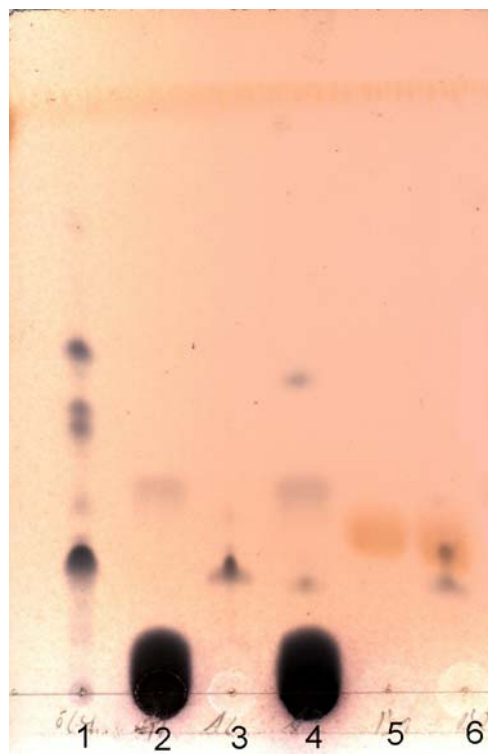


Abbildung 3.40: Dünnschichtchromatogramm der Umsetzung von GL 3 mittels β -Galactosidasen (Bedingungen im Text). NP-Kieselgel, Laufmittel (Chloroform/Methanol/Wasser (65/15/2; v/v/v)).
1: natives Glycolipidgemisch (GL 1, GL 2, GL 3)
2: β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) in Phosphatpuffer
3: GL 3 in Phosphatpuffer
4: β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) + GL 3 in Phosphatpuffer
5: β -Galactosidase (*Saccharomyces fragilis*) in Phosphatpuffer
6: β -Galactosidase (*Saccharomyces fragilis*) + GL 3 in Phosphatpuffer

Folgende Versuchsbedingungen wurden gewählt:

- 10 ml Ansätze (Phosphatpuffer 100 mmol; pH 7.5)
- 100 Upm
- Temperatur 30 °C
- 1 g/l GL 3
- 5-10 U/ml Enzym (β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae*
 β -Galactosidase aus *Saccharomyces fragilis*)

Die Ergebnisse sind in dem Dünnschichtchromatogramm der Abbildung 3.40 dargestellt. Bei dem Ansatz mit der β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* ist wie bei der Umsetzung mit der Naringinase ein neues Produkt mit dem R_F -Wert des GL 2 zu erkennen. Die möglicherweise abgespaltene Galactose wäre auf der DC nicht zu erkennen, da sich der Zuckerspot mit dem vom stabilisierenden Zucker des Enzyms überlagert. Nach der Isolierung der einzelnen Komponenten mittels MPLC konnte das neue Produkt mit Hilfe der ^1H -NMR als GL 2 identifiziert werden. Der Zucker wurde ebenfalls isoliert und als Galactose identifiziert. Daraus resultiert das Reaktionsschema, wie es in Abbildung 3.41 dargestellt ist.

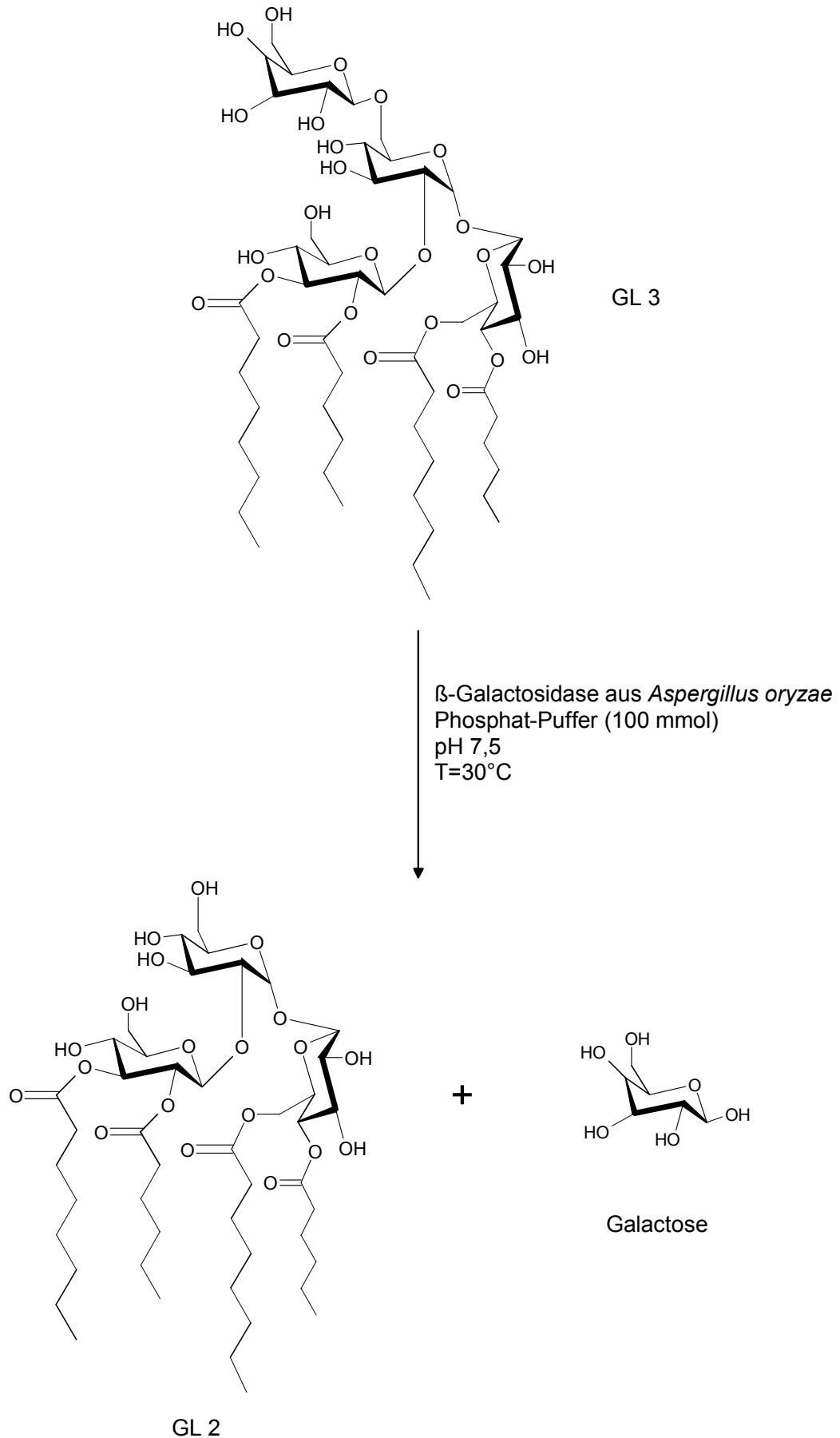


Abbildung 3.41: Abspaltung der Galactoseeinheit vom GL 3 mittels β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae*.

3.6 Physikochemische Eigenschaften

Da es sich bei den von *Tsukamurella spec.* synthetisierten Glycolipiden um Moleküle mit amphiphilen Charakter handelt, wurden schon in vorangegangenen Arbeiten verschiedene physikochemische Untersuchungen bezüglich ihrer möglichen Verwendung als Biotenside durchgeführt. Unter diesem Begriff werden von Mikroorganismen gebildete ober- und grenzflächenaktive Substanzen zusammengefasst. Zu den Biotensiden gehört die Stoffklasse der Glycolipide. Sie setzen sich zusammen aus einem polaren Zuckeranteil und einem esterförmig oder glycosidisch gebundenen unpolaren Aglycon, der aus (Hydroxy-) Carbonsäuren besteht. Hier sollen die physikochemischen Eigenschaften sowohl der nativen Glycolipide vervollständigt als auch jene, der durch Modifikation neu synthetisierten Glycolipide bestimmt werden.

3.6.1 Löslichkeit der Glycolipide in Wasser

Als erste physikalische Eigenschaft, die als Grundlage für oben genannten Untersuchungen diene, wurde die Löslichkeit (Tabelle 3.28) der einzelnen Glycolipide in Wasser untersucht ($T = 30^{\circ}\text{C}$; entspricht Kultivierungsbedingungen).

Tabelle 3.28: Löslichkeit und Stabilität der einzelnen Glycolipide in Wasser. n.b. nicht bestimmt, 24 h.

Glycolipid	Löslichkeit in Wasser bei 30°C	Stabilität in Wasser bei 4°C	Stabilität in Wasser bei 25°C
GL 1	23 g l ⁻¹	100%	100%
GL 1b	21 g l ⁻¹	100%	100%
GL 2	25 g l ⁻¹	100%	100%
GL 3	28 g l ⁻¹	100%	100%
natives GL-Gemisch	25 g l ⁻¹	100%	100%
GL 3-Ölsäure 1	n.b.	100%	100%
GL 3-Pentensäure 1*	n.b.	100%	100%

*) Die Verbindung GL 3-Pentensäure 1 entspricht der synthetisierten Form von GL 3 –Ölsäure 1, allerdings unter Verwendung von 4-Pentensäure statt Ölsäure (vgl. Abschnitt 3.5.3).

Gleichzeitig konnte hierbei die Stabilität der durch Modifikation hergestellten Glycolipide in Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen dokumentiert werden. Es zeigte sich, dass die modifizierten Glycolipide in Wasser als alleiniges Lösungsmittel eine hohe Stabilität aufwiesen dagegen aber Wasser bei der Isolierung dieser Glycolipide einen negativen Einfluss auf ihre Stabilität ausübte (Abschnitt 3.5.3).

3.6.2 Einfluss auf die Oberflächenspannung von Wasser; kritische Micellbildungskonzentration (cmc)

An der Oberfläche einer Flüssigkeitsphase sind die Kohäsionskräfte, die die Teilchen in der kondensierten Phase zusammenhalten, anisotrop. Die daraus resultierende Zugspannung wird als Oberflächenspannung (Grenzbereich kondensierte Phase/Gasoberfläche) bezeichnet. Infolge dieser Kraft versuchen Flüssigkeiten eine minimale Oberfläche, d.h. Kugelgestalt anzunehmen. Bringt man oberflächenaktive Substanzen in die Flüssigkeit ein, so werden die intermolekularen Wechselwirkungen beeinflusst und es kommt zu einer Erniedrigung der Oberflächenspannung.

In verdünnten wässrigen Lösungen liegen Tenside in Abhängigkeit von ihrer Konzentration monodispers an der Oberfläche oder zu größeren Aggregaten zusammengelagert vor. Bei genügend hoher Löslichkeit assoziieren die Moleküle ab einer als kritische Micellbildungskonzentration (cmc) bezeichneten Konzentration zu Micellen, ohne sich weiter an der Grenzfläche anzureichern. Oberhalb des cmc-Wertes führt eine Konzentrationserhöhung zu verstärkter Micellbildung, die Oberflächenspannung bleibt dagegen konstant.

In Abbildung 3.42 sind zur Charakterisierung der Oberflächenaktivität die σ/c -Isothermen der isolierten Glycolipide, der Glycolipidgemische und der neu synthetisierten Glycolipide halblogarithmisch dargestellt.

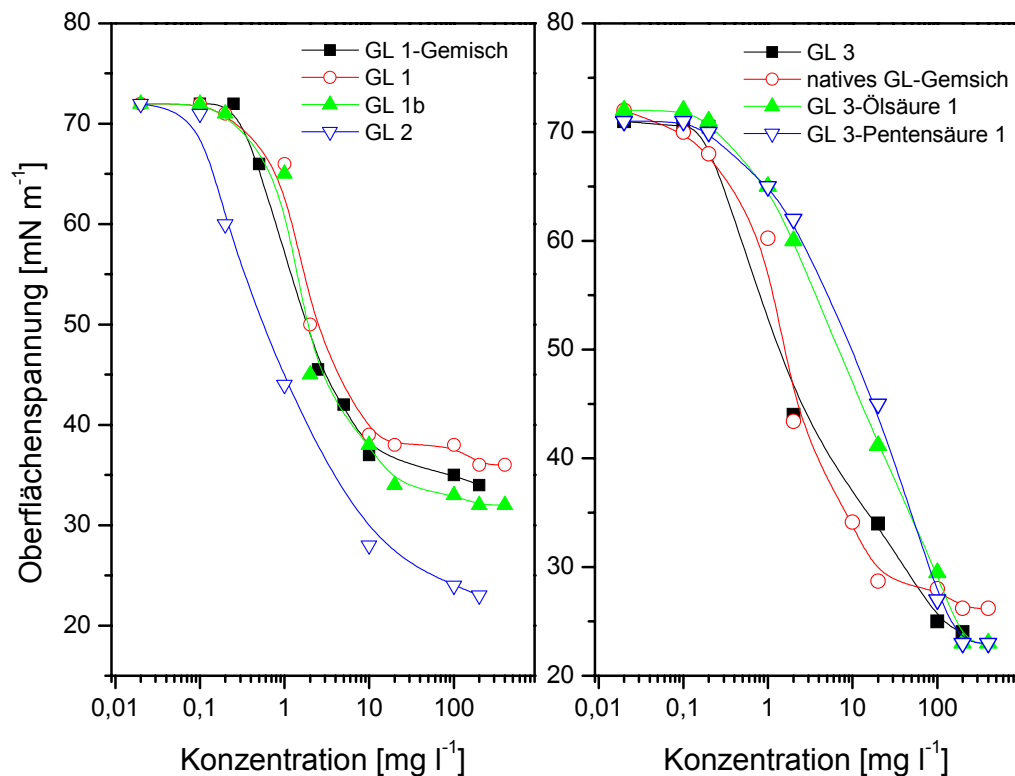


Abbildung 3.42: σ/c -Isothermen der isolierten Glycolipide und Glycolipidgemische in dest. Wasser bei 25°C, aufgenommen nach der Ringmethode.

Vgl. Vollbrecht Daten [VOLLBRECHT, 1999]:

GL 1-	cmc 10 mg l ⁻¹ ,	σ_{CMC} 35 mN m ⁻¹
GL 2-	cmc 100 mg l ⁻¹ ,	σ_{CMC} 23 mN m ⁻¹
GL 3-	cmc 100 mg l ⁻¹ ,	σ_{CMC} 24 mN m ⁻¹

Die experimentellen Daten zeigen, dass GL 1 die Oberflächenspannung von Wasser, bei einem cmc-Wert in der Größenordnung von 10 mg l⁻¹ (Tabelle 3.21), von 72 mN m⁻¹ auf 36 mN m⁻¹ reduzierte. GL 1b, das zum Unterschied von GL 1 einen weiteren Acylrest besitzt, unterschied sich im CMC-Wert nur unwesentlich von GL 1, erreichte aber eine minimale Oberflächenspannung von 32 mN m⁻¹.

Die beiden nativen Glycolipide GL 2 und GL 3 zeigten bessere Grenzflächeneigenschaften mit einer minimal erreichbaren Oberflächenspannung von 23 und 24 mN m⁻¹ und cmc-Werten um 100 mg l⁻¹.

Die modifizierten Glycolipide (GL 3-Ölsäure 1 und GL 3-Pentensäure 1) erniedrigten die Oberflächenspannung ebenfalls relativ deutlich bis auf etwa 23 mN m⁻¹. Diese Werte wurden allerdings erst bei höheren cmc-Werten (200 mg l⁻¹) erreicht.

Tabelle 3.29: CMC-Werte und minimale Oberflächenspannungen von Wasser, die durch die verschiedenen Glycolipide und Gemische erreicht wurden.

Glycolipid	mittleres Molekulargewicht [g mol ⁻¹]	cmc [mg l ⁻¹]	cmc [mol l ⁻¹]	σ_{CMC} [mN m ⁻¹]
GL 1 Gemisch (nativ)	808	10	$1.24 \cdot 10^{-5}$	34
GL 1	676	10	$1.48 \cdot 10^{-5}$	36
GL 1b	940	20	$2.13 \cdot 10^{-5}$	32
GL 2	952	100	$10.5 \cdot 10^{-5}$	23
GL 3	1114	100	$8.98 \cdot 10^{-5}$	24
natives GL-Gemisch	958	50	$5.22 \cdot 10^{-5}$	27
GL 3-Ölsäure 1	1378	200	$14.51 \cdot 10^{-5}$	23
GL 3-Pentensäure 1	1194	200	$16.75 \cdot 10^{-5}$	23

3.6.3 Emulsionsstabilität und HLB-Wert

Emulsionen sind Zweistoffsysteme, bestehend aus einer meist im Überschuss vorhandenen kontinuierlichen oder äußeren Phase und einer in dieser äußeren Phase dispergierten Flüssigkeit. Je nachdem welche Phase als kontinuierliche Phase vorliegt, unterscheidet man Wasser in Öl und Öl in Wasser Emulsionen.

Der HLB-Wert, der das hydrophile-lipophile Gleichgewicht in einem Molekül beschreibt, wurde für die isolierten Glycolipide, Glycolipidgemische und die modifizierten Glycolipide experimentell mit einem System aus Sojaöl (HLB 6) und Cyclohexan (HLB 15) bestimmt (Abschnitt 2.7.2). Der HLB-Wert, bei dem das eingesetzte Substratgemisch am besten emulgiert wurde, entsprach dem HLB-Wert des jeweiligen Biotensids. In Abbildung 3.43 sind die Messergebnisse für alle Glycolipide dargestellt.

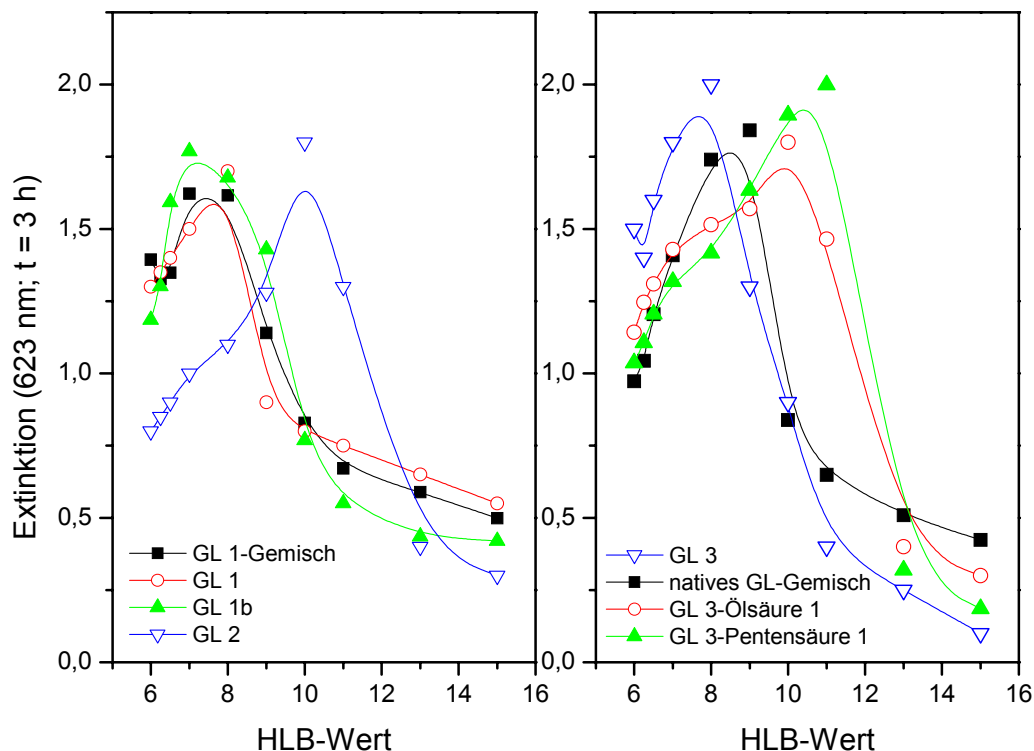


Abbildung 3.43: Experimentelle HLB-Wert-Bestimmung der isolierten Glycolipide und Glycolipidgemische. 0.25 g l⁻¹ Emulgator, 2.5% hydrophobe Phase, 4 ml Wasser. Vgl. Vollbrecht Daten [VOLLBRECHT, 1999]:

GL 1 - HLB-Wert 8
 GL 2 - HLB-Wert 10
 GL 3 - HLB-Wert 8

Es ergab sich bei allen Messungen der typische Verlauf einer Glockenkurve. Der experimentell bestimmte HLB-Wert wich dabei bei manchen Verbindungen deutlich von dem berechneten Wert ab (Tabelle 3.30; Abschnitt 2.7.2). Mit einem maximalen HLB-Wert von 8 für GL 1, GL 1-Gemisch, GL 3 und dem nativen GL-Gemisch sind diese Substanzen optimale Tenside für z.B. das als Substrat verwendete Sonnenblumenöl. Erstaunlich ist, dass die modifizierten Glycolipide mit einem erhöhten lipophilen Molekularanteil gegenüber dem nativen GL 3 eine hydrophilere Emulgatoreigenschaft aufweisen als das native Ausgangsmolekül. Mit einem Wert über 10 gehören sie eher zu den wasserlöslichen Tensiden.

Tabelle 3.30: Vergleich: Experimentelle und rechnerische HLB-Wert-Bestimmung.

Glycolipid	HLB-Wert berechnet (gemittelt)	HLB-Wert gemessen
GL 1	9.1	8
GL 1b	6,5	7
GL 1-Gemisch	7.8	8
GL 2	10.5	10
GL 3	11.9	8
natives GL-Gemisch	10.2	9
GL 3-Ölsäure 1	9.5	10
GL 3-Pentensäure 1	11.1	11

Abbildung 3.44 zeigt exemplarisch am Beispiel des nativen GL-Gemisches die Emulgation verschiedener Substrate sowohl als Ö/W- als auch als W/Ö-Emulsion. Das native GL-Gemisch wurde gewählt, da Gemische oft bessere Emulgatoreigenschaften besitzen als die jeweils einzelnen Komponenten für sich; desweiteren würden aufwendige Aufarbeitungsschritte entfallen. Die eingesetzte Tensidkonzentration betrug 0.5 g l^{-1} . Als hydrophobe Phase wurden Sonnenblumenöl, Kerosin und Mineralöl eingesetzt. Durch die Verwendung eines 40-fachen Überschusses der äußeren Phase wurden die jeweiligen Ö/W- und W/Ö-Emulsionen erzwungen. Entsprechend dem bereits bestimmten HLB-Wert von etwa 9 verhielten sich Ö/W-Emulsionen ähnlich stabil wie W/Ö-Emulsionen. Der Vergleich der Substrate zeigte die zu erwartende Tendenz. Das Sonnenblumenöl (HLB 8) wurde jeweils optimal emulgiert.

HLB-Werte für Ö/W-Emulsion:

Sonnenblumenöl	8
Kerosin	keine Angabe
Mineralöl	10-12

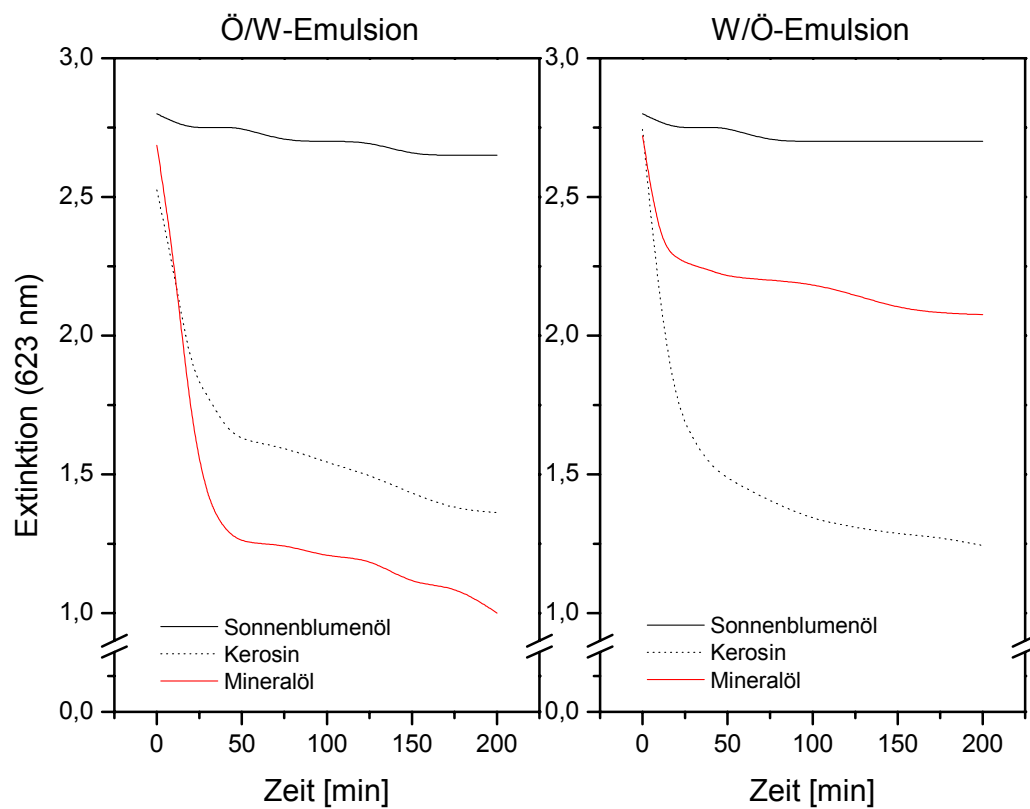


Abbildung 3.44: Emulsionsstabilität von W/Ö- und Ö/W- Emulsionen des nativen Glycolipidgemisches (0.5 g l^{-1}).

3.7 Biologische Aktivität

Ziel dieser Arbeit war es, auch das biologische Potential der nativen und der modifizierten Glycolipide zu beschreiben. Von einer Reihe mikrobieller Glycolipide ist bekannt, dass sie antimikrobiell wirken können [LANG et al., 1989]. Beispiele hierfür sind die Sophorose- und Rhamnoselipide. Zahlreiche neuere Untersuchungen beschreiben weiterhin immunstimulierende Eigenschaften und belegen die Rolle der Oligosaccharide und Glycolipide innerhalb der komplexen Prozesse der Zellerkennung und Immunabwehr [HOLST et al., 1996; AZUMA et al., 1988; ISODA et al., 1995; 1996; 1997; WAKAMATSU et al., 2001].

3.7.1 Antimikrobielle Eigenschaften

Die toxische Wirkung der Glycolipide gegen Bakterien, Pilze und Algen lässt sich in *vitro* leicht bestimmen. Hierzu wurde die Hemmung oder Abtötung der Testorganismen zunächst über einen qualitativen Agardiffusionstest verfolgt (Abschnitt 2.8.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.31 dargestellt

Das Gemisch der hydrolysierten Zuckergrundgerüste G 123 (G1+G2+G3) zeigte hier, wie erwartet, kaum Wirkung gegen die Testorganismen. Der pathogene Stamm *Staphylococcus aureus* konnte durch keine Substanz im Wachstum gehemmt werden. Ebenso der Pilz *Microbotryum violaeum*. *Mycothypha microspora* wurde nur durch GL 3-Ölsäure1 und GL 3-Pentensäure1 in hoher Konzentration geringfügig im Wachstum eingeschränkt. Die Alge *Chlorella fusca* wurde ebenfalls nur durch diese beiden modifizierten Glycolipide und zusätzlich durch GL 3 gehemmt. Die modifizierten Glycolipide GL 3-Ölsäure1 und GL 3-Pentensäure1 zeigten die größte bakteriozide Aktivität, sowohl bei Gram-positiven (*B. megaterium*) als auch bei Gram-negativen (*E. coli*) Bakterien. Gegenüber dem Pilz *Ustilago violacea* konnte bei allen getesteten Substanzen eine wachstumshemmende Wirkung beobachtet werden.

Tabelle 3.31: Antimikrobielle Wirkung der untersuchten Reinsubstanzen und Gemische gegenüber verschiedenen Testorganismen im Agardiffusionstest.

Testsubstanz	μg Substanz/ Plättchen	Testorganismen* / Hemmwirkung [mm]						
		1	2	3	4	5	6	7
GL 1	20	-	5	-	-	-	-	-
	500	-	10	-	-	5	5	-
GL 1b	20	-	-	-	-	-	5	-
	500	-	5	-	-	10	11	-
GL 1-Gemisch	20	-	5	-	-	-	-	-
	500	-	11	-	-	5	5	-
GL 2	20	-	-	-	-	-	-	-
	500	-	9	-	-	5	9	-
GL 3	20	-	5	-	-	-	10	-
	500	-	10	-	5	5	12	-
GL - Gemisch	20	-	10	-	-	-	-	-
	500	-	17	-	-	5	8	-
GL3-Ölsäure1	20	-	10	-	-	-	10	-
	500	5	22	-	5	9	15	-
GL 3- Pentensäure1	20	-	7	-	-	5	10	-
	500	5	12	-	5	15	18	-
G 123	20	-	-	-	-	-	-	-
	500	-	11	-	-	-	-	-

Organismen: 1) *Mycothypha microspora*, 2) *Ustilago violacea*, 3) *Microbotryum violaeum*
 4) *Chlorella fusca*, 5) *Escherichia coli*, 6) *Bacillus megaterium*,
 7) *Staphylococcus aureus*

Um die praktische Anwendbarkeit von antimikrobiellen Substanzen beurteilen zu können, ist nicht nur die Hemmwirkung *in vitro*, sondern auch die *in vivo* nötige Wirkstoffkonzentration von Bedeutung. Diese ist abhängig vom Verhalten des Wirkstoffes bei Aufnahme, Resorption und Ausscheidung, dem Grad der Inaktivierung beim Eindringen in das Gewebe und auch von Faktoren wie der Löslichkeit und Toxizität. Um die beobachteten antibakteriellen und fungiziden Wirkungen zu quantifizieren, wurden die Testsubstanzen im Bouillion-Dillutionstest (Abschnitt 2.8.2) eingesetzt. Tabelle 3.32 zeigt die ermittelten MHK- und IC₅₀-Werte bei den Organismen, die am wirkungsvollsten gehemmt wurden. Die Untersuchung der modifizierten Glycolipide konnte hier nicht durchgeführt werden, da nicht genügend Substanzmenge zur Verfügung stand.

Tabelle 3.32: MHK- und IC₅₀-Werte der untersuchten Glycolipide.

Substanz	Testorganismus	MHK-Wert [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	IC ₅₀ [$\mu\text{g ml}^{-1}$]
GL –Gemisch	<i>Bacillus megaterium</i>	400	100
	<i>Escherichia coli</i>	>1000	300
	<i>Ustilago violacea</i>	300	100
GL 1	<i>Bacillus megaterium</i>	500	150*
	<i>Escherichia coli</i>	>1000	300
	<i>Ustilago violacea</i>	300	100
GL 1b	<i>Bacillus megaterium</i>	300	100
	<i>Escherichia coli</i>	1000	300
	<i>Ustilago violacea</i>	300	150
GL 2	<i>Bacillus megaterium</i>	400	150*
	<i>Escherichia coli</i>	>1000	300
	<i>Ustilago violacea</i>	500	100
GL 3	<i>Bacillus megaterium</i>	300	50*
	<i>Escherichia coli</i>	1000	300
	<i>Ustilago violacea</i>	500	200

* Vgl. Daten von Vollbrecht [VOLLBRECHT, 1999]

Die bereits im Agardiffusionstest beobachtete Tendenz in den Ergebnissen konnte auch hier bestätigt werden. GL 3 und GL 1b besaßen die größte Wirkung gegenüber *Bacillus megaterium* wohingegen GL 1 und GL 2 eine höhere fungizide Wirkung aufwiesen.

3.7.2 Pharmakologische Assays

Im Hinblick auf pharmazeutische Applikationen wurden die nativen Glycolipide und das Tetrasaccharid G 3 an verschiedene auswärtige Institute und Firmen weitergegeben und dort getestet (Abschnitt 2.8.3).

Sowohl bei den Zytotoxizitätstests gegen die Tumorzelllinien HM02 (Margencarcinom), HEP-G2 (Lebercarcinom) und L 5178 als auch bei den Neuroprotektionstest konnte keine Aktivität beobachtet werden. Ein antiviraler Assay, bei dem humane Fibroblasten (A549) auf Resistenz gegen den Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) getestet wurden, verlief ebenfalls negativ.

Am Institut für Molekulare Medizin und Naturstoffforschung (KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg) wurden die Reinsubstanzen auf Hemmung bzw. Aktivierung einer Reihe von Proteinkinasen getestet. Proteinkinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstum, Teilung und Differenzierung von Zellen. Sie sind an mindestens drei verschiedenen molekularen Mechanismen beteiligt, die in engem Zusammenhang mit der Tumorentwicklung stehen.

Tabelle 3.33 zeigt die erhaltenen Messdaten. Aktivierung einer Kinase ergaben positive Werte, während negative Messwerte einer Hemmung entsprachen. Die getesteten Glycolipide hemmten die verschiedenen Proteinkinasen, eine Aktivierung konnte nicht beobachtet werden. Das Tetrasaccharid zeigte dagegen bis auf eine Aktivierung der CDK4/Cyklin D1 kaum Wirkung auf die anderen Kinasen. Von fünfzehn getesteten Kinasen wurden bei einem Zusatz von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ GL 3 vierzehn stark und nur eine schwach gehemmt. Eine starke inhibierende Wirkung von GL 1 und GL 2 konnte dagegen nur bei sechs bis sieben Kinasen beobachtet werden.

Keine der Verbindungen zeigte eine spezifische Wirkung gegen nur eine Kinase. Dennoch geben diese Ergebnisse einen ersten Hinweis auf antitumorale Wirkung.

Tabelle 3.33: Hemmung verschiedener Proteinkinasen durch die nativen Glycolipide und das Tetrasaccharid G 3 (n.b. – nicht bestimmt).

Proteinkinase	Wirkung [%]			
	GL 1	GL 2	GL 3	G 3
CDK4/Cyclin D1	-116	-20*	-54*	+52
PDGFR- β -Kinase	n.b.	-95*	-91*	n.b.
PKC-epsilon	n.b.	-31*	-62*	n.b.
CDK2/Cyclin E	-77	-45*	-111*	-4
EGFR Kinase	-86	-67*	-90*	+14
ErbB2	-80	-91*	-98*	+2
FGFR1	n.b.	-75*	-91*	n.b.
JAK2	n.b.	-90*	-91*	n.b.
IGFR1	-32	-77*	-90*	+14
InsR	n.b.	-79*	-84*	n.b.
PKC γ (aktiv)	n.b.	-24*	-39*	n.b.
TIE-2	-51	n.b.	-80	+9
KDR	-34	n.b.	-89	+8
PKB (aktiv)	-24	n.b.	-53	-1
FLT-4	-89	n.b.	-89	-8

* Vgl. Daten von Vollbrecht [VOLLBRECHT, 1999]

In einem weiteren Test zur antitumoralen Wirkung der nativen Glycolipide und des Tetrasaccharids konnte die Anti-Tumor-Promoting-Aktivität durch die Inhibierung der durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) induzierten Aktivierung eines frühen Antigens des *Epstein-Barr-Virus* (EBVA-EA) beobachtet werden (H. Tokuda, Kyoto Prefectural University of Medicine).

Alle getesteten Substanzen wiesen eine deutliche antitumorale Aktivität auf (s. Tabelle 3.34). Insbesondere der Zucker G 3 und das Glycolipid GL 1 erniedrigten die Aktivität des EBV-EA schon bei geringen Konzentrationen. Erstaunlich war auch, dass bei einem 1000fachen molaren Überschuss die Substanzen nur geringe toxische Wirkung zeigten. So war bei GL 2 eine 80%ige Überlebensrate der Zellen zu beobachten.

Tabelle 3.34: Inhibierung der TPA-induzierten Aktivierung des *Epstein-Barr-Virus* Early Antigen.

Substanz	Aktivität in % der Kontrollprobe*			
	Konzentration (mol ratio/TPA)			
	1000	500	100	10
GL 1****	9.2 (60)**	46.4	74.0	100
GL 1b	12.5 (70)**	53.6	81.5	100
GL 2	24.1 (80)**	62.5	86.3	100
GL 3****	10.5 (60)**	47.0	76.4	100
G 3****	2.6 (60)**	40.9	69.5	89.5
GL 3-Ölsäure 1	11.7 (70)**	59.4	80.3	100
GL 3-Pentensäure 1	12.5 (70)**	53.6	81.5	100
GG***	0(70)**	20.7	62.4	82.5

* Kontrollprobe TPA 32 pmol = 100%; ** Überlebensrate der Raji-Zellen (EBV-Genom tragende menschliche lymphoblastische Zellen); *** 3-O-D-β-Galactopyranosylglycerin [COLOMBO et al., 1996].

**** Vgl. Daten von Vollbrecht [VOLLBRECHT, 1999]

4 DISKUSSION

Zur Funktion und zum technischen Potential von Biotensiden ist in Kapitel 1 ausführlich eingegangen worden. Die Biotenside GL 1 und GL 1b des in dieser Arbeit verwendeten bakteriellen Stammes *Tsukamurella spec.*, der sich in die weit verbreitete Gruppe der mycolsäurehaltigen Actinomyceten eingliedert, können zu den aus der Literatur bekannten Trehaloselipiden gezählt werden. Die meisten beschriebenen Glycolipide, die auf dem Disaccharid α,α' -Trehalose basieren, werden von mycolsäurehaltigen Organismen gebildet. Mycolsäuren selbst finden sich auch als Lipidkomponenten der Glycolipide [GOREN, 1972; ASSELINEAU et al., 1978]. Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über Trehaloselipide und deren mikrobielle Produzenten.

Tabelle 4.1: Microbielle Trehaloselipide

Trehaloselipid	Mikroorganismus	Literatur
Trehaloselipide (2,3)	<i>Tsukamurella spec.</i>	[Vollbrecht et al., 1999]
Trehaloselipide (2,3,6')	<i>Tsukamurella spec.</i>	[Vollbrecht et al., 1999]
Trehaloselipid	<i>Mycobacterium paraffinicum</i>	[Batrakov et al., 1981]
Trehalose-trimycolate(2,3,6')	<i>Rhodococcus aurantiacus</i> *	[Tomiyasu et al., 1986]
Mono- und Di-Succinoyltrehaloselipide	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	[Uchida et al., 1989]
Trehalose-tetraester (1,2,2',3)	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	[Ristau & Wagner, 1983]
Trehalose-tetraester (2,2',3,4)	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	[Kim et al., 1990]
	<i>Arthrobacter</i> sp. EK1	[Passeri et al., 1991]
	<i>Arthrobacter</i> sp. SI1	[Schulz et al., 1991]
	<i>Rhodococcus</i> sp. 51T7	[Espuny et al., 1996]
Trehalose-dicorynomycolate(6,6')	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	[Rapp et al., 1979]
Trehalose-monocorynomycolate(6,6')	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	[Kretschmer et al., 1982]

* Die Gattung *Tsukamurella* wurde 1988 eingeführt [COLLINS et al., 1988], um die Spezies *Corynebacterium paurometabolum* und *Rhodococcus aurantiacus* (ehemals *Gordona aurantiaca*) in einer neuen Untergruppe zusammenzufassen. Die Bezeichnungen *Corynebacterium paurometabolum* und *Rhodococcus aurantiacus* sind daher Synonyme für Organismen einer Art.

Die bei *Tsukamurella* spec. zusätzlich gefundenen Produkte GL 2 und GL 3 werden zur Gruppe der Oligosaccharidlipide gezählt. Folgende Hauptkomponenten konnten identifiziert werden:

- GL 1: 2,3-Di-O-acyl- α -D-glucopyranosyl-(1-1)- α -D-glucopyranose
- GL 1b: 2,3-Di-O-acyl- α -D-glucopyranosyl-(1-1)-6-mono-O-acyl- α -D-glucopyranose
- GL 2: 2,3-Di-O-acyl- β -D-glucopyranosyl-(1-2)-4,6-di-O-acyl- α -D-glucopyranosyl-(1-1)- α -D-glucopyranose
- GL 3: 2,3-Di-O-acyl- β -D-glycopyranolsyl-(1-2)- β -D-galactopyranosyl-(1-6)-4,6-di-O-acyl- α -D-glucopyranosyl-(1-1)- α -D-glucopyranose

Mikrobielle Oligosaccharidlipide werden unter anderem von verschiedenen *Mycobacterium* spp. produziert; sie werden als gattungsspezifische Oberflächenantigene angesehen. Die ersten Isolate waren Pentasaccharidlipide, die durch ethanolische Extraktion der Zellen von *Mycobacterium smegmatis* ATCC 356 erhalten wurden [SAADAT et al., 1983; KAMISANGO et al., 1985; HARTMANN et al., 1994]. Weiterhin konnten aus dem Lipidextrakt von *Mycobacterium kansasii* Oligosaccharidlipide mit einem Tetrasaccharidkern isoliert werden [HUNTER et al., 1983]; zudem konnten Xylose, Fructose als weitere Zuckerbestandteile beobachtet werden [BRENNAN, 1988]. Wie beschrieben, lassen sich auch innerhalb der ungewöhnlichen Zuckergerüste von GL 2 und GL 3 verschiedene Disaccharid-untereinheiten erkennen; neben einer entsprechenden Trehalose-Einheit auch eine Sophorose-Einheit. Letzterer Baustein ist von anderen Biotensiden, wie z.B. bei den von der Hefe *Candida bombicola* gebildeten Sophoroselipiden, bekannt [ASMER et al., 1988].

Aufgrund der ungewöhnlichen und neuartigen Struktur der durch *Tsukamurella* spec. produzierten Glycolipide und ihrer teilweise bereits beschriebenen biologischen und physikochemischen Eigenschaften [VOLLBRECHT, 1999] sowie der schon in den Voruntersuchungen erzielten guten Ausbeuten schienen weiterführende und optimierende Untersuchungen sehr sinnvoll. Wegen der zunehmenden Bedeutung der Glycolipide und strukturähnlicher Verbindungen als bioaktive Wirkstoffe in der pharmazeutischen Forschung [COLOMBO et al., 1998; MATSUFUJI et al., 2000;

MURAKAMI et al., 1995] sollte getestet werden, ob die bioaktive Wirkung der durch chemische Synthese nur schwer oder gar nicht zu realisierenden Leitstrukturen durch gezielte enzymatische Modifikation gesteigert werden kann. Verwiesen sei hierbei auf die Arbeiten von Klibanov [KLIBANOV et al., 1986] im Rahmen der Acylierung von Kohlenhydraten oder die Modifikation des bioaktiven 2-O- β -D-Galctosylglycerols mittels Lipasen, wobei unterschiedliche Acylderivate erhalten werden konnten, die alle Anti-Tumor-Promoting-Aktivitäten aufwiesen [COLOMBO et al., 1998].

4.1 Analyseverfahren

Um eines der Ziele, die Optimierung der Glycolipidproduktion, so genau wie möglich dokumentieren zu können, war es nötig, ein einfaches und fehlerminimiertes Analysesystem zu entwickeln. Auf die Unzulänglichkeiten des vorher üblichen Analyseverfahrens mittels Dünnschichtchromatographie und Densitometrie wurde bereits in Kapitel 3.2 kurz eingegangen. Das Prinzip bestand darin, dass die angefärbten Spots einer DC in einem Densitometer photometrisch vermessen wurden. Ein wandernder Lichtpunkt (monochromatisches Licht – entsprechend der Farbe der Spots) tastete in einem vorgegeben Areal die einzelnen Bahnen der DC ab und eine Photoeinheit registrierte das reflektierte Licht. Das gemessene elektrische Signal gab Auskunft über die Lage, die Form und die Intensität des vermessenen Spots. Die Fehleranfälligkeit dieses Systems lag unter anderem an folgenden Punkten:

- manuelle Auftragung der Substanzen mittels Hamilton-Spritze

Da keine automatische Probenaufgabe zur Verfügung stand, kam es schon bei der Probenaufgabe zu Ungenauigkeiten, die einen Einfluss auf die spätere Auswertung hatten. Die aufgetragene Probenmenge betrug 10 μ l und als Lösungsmittel wurde meistens MTBE verwendet. Beim Befüllen der Spritze kam es deshalb schon bei Raumtemperatur zum Verdunsten der Probe, sodass oft nicht die gewünschte, sondern eine geringere Probenmenge aufgetragen wurde. Die Auftragungsgeschwindigkeit hatte ebenfalls einen großen Einfluss auf das Messergebnis, denn sie bestimmte die Breite des Spots und damit die Intensität der Färbung bei der nachfolgenden Detektion.

- manuelle Auftragung der Sprühreagenzien

Nach dem Entwickeln und Trocknen der DC wurde sie mittels einer Sprühflasche und Druckluft mit dem Detektionsreagenz besprüht. Dabei kam es zu einer ungleichmäßigen Verteilung des Reagenz auf der DC. Dies führte zu einer ungleichmäßigen Färbung der einzelnen Spots.

- manuelles Trocknen der Sprühreagenzien

Das Aufheizen der DC mit dem aufgetragenen Reagenz auf 180°C geschah in einem Trockenschrank. Dies gewährleistete allerdings keine gleichmäßige Färbung über die gesamte DC. Gerade bei größeren DC's trocknete der Rand wesentlich schneller und damit kam es auch zu einer stärkeren Färbung der randnahen Spots. Nachteilig wirkt sich hierbei auch die unbekannte variable Zeitdauer der Trocknung bei unterschiedlichen DC-Größen auf das Messergebnis aus. So war es möglich, dass DC's zum Teil zu kurz oder zu lange im Ofen erhitzt wurden. Dies hatte sowohl Einfluss auf die Färbung der einzelnen Spots als auch, je nach der Menge des aufgetragenen Reagenz, auf die Hintergrundfärbung der gesamten DC. Dies wiederum führte zu einer schlechteren Signalintensität auf Grund des geringeren Kontrasts der einzelnen Spots.

- Laufverhalten

Die Entwicklung der DC wurde in einer Standard-DC-Kammer durchgeführt. Es war zu beobachten, dass gerade in den Randbereichen kein linearer Chromatographieverlauf zu erreichen war. Die Laufbanden lagen nicht parallel zueinander.

Die oben angeführten Fehler bei der DC-Entwicklung hatten folgende Auswirkungen bei der Messung im Densitometer. Je nach Auftragung konnten die Form der einzelnen Spots vor allem in der Breite variieren. Schon STAHL [1966] beschrieb die Auswirkung der Spot- Größe und Form auf das Ergebnis. Bei dem hier verwendeten Densitometer hatte eine zu große Spotbreite noch einen weiteren negativen Einfluss. Die Abtastbreite der einzelnen Bahnen ist limitiert durch die Breite des abtastenden Lichtstrahls. Da im günstigsten Fall die Mitte des Spots als Abtastkoordinate getroffen wurde, konnte das Peakmaximum, zumindest was die Farbintensität betrifft, ermittelt werden. Aber bei einer Spotgröße größer als die Abtastbreite gibt das

ermittelte Signalintegral nicht die gesamte Spotfläche, bezogen auf die Fläche und auf die Intensität der Färbung, wieder und es ergibt sich ein Fehler im Verhältnis Signal/Peakfläche und der daraus ermittelten Konzentration. Die unterschiedliche Färbung der Spots auf Grund der unterschiedlichen Verteilung des Sprühreagenz und der nicht gleichmäßigen Aufheizung führte ebenfalls zu unterschiedlicher Färbung der einzelnen Spots und damit auch zu einem verfälschten Messergebnis. Da das unterschiedliche Laufverhalten auf der DC durch geeignete Abstandswahl minimiert werden konnte, ist aber dennoch zu beachten, dass nur geringe Abweichung im parallelen Laufverhalten der einzelnen Bahnen zu großen Messfehlern führte. Da die Abtastung der einzelnen Bahnen parallel erfolgte und keine automatische Bahnnachführung zur Verfügung stand, war es möglich, dass der Abtaststrahl nicht immer die Mitte des Peaks vermessen konnte und somit natürlich auch nicht das reale Peakmaximum ermittelte.

Zwar erlaubte die Bestimmung mittels DC eine erste Aussagen über die Zusammensetzung und die Produktion von Glycolipiden, versagte aber im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit und die quantitative Aussage der Messergebnisse. Diese Ungenauigkeit der Konzentrationsbestimmung war auch schon bei vorherigen Arbeiten bekannt. Dies kann die Ursache sein, dass die früher beschriebenen Produktionsleistungen nicht mit den hier dargestellten Ergebnissen verglichen werden können. So kommt z.B. Vollbrecht [VOLLBRECHT, 1999] zu wesentlich höheren Produktkonzentrationen bei einfachen unlimitierten Schüttelkolbenkultivierungen als es bei den hier durchgeführten Untersuchungen der Fall war. Erstaunlich dabei ist, dass höhere Produktkonzentrationen beschrieben wurden, als in Wasser löslich sind, obwohl nur die Kultursuspension ohne Biomasse zur Konzentrationsbestimmung herangezogen wurde und dabei kein ausgefallenes Produkt beobachtet werden konnte; zumal Vollbrecht selbst wesentlich kleinere Werte in Bezug auf die Löslichkeit der Glycolipide angibt, als die hier ermittelten und durch HPLC-Messung bestätigten Messergebnisse.

Angelehnt an das Dünnschichtchromatographiesystem konnte ein Normalphasen-HPLC-System etabliert werden, welches ebenfalls eine Trennung der Glycolipide nach ihrem Zuckergrundgerüst erlaubte. Auf Grund der Detektorwahl und Einschränkungen in der Laufmittelwahl musste allerdings auf ein Zwei-Komponenten-Gradienten-System ausgewichen werden. Es zeigte sich, dass mit einem

Messverfahren sowohl die Produkt- als auch die Eduktverläufe zu dokumentieren waren. Durch den Systemwechsel war eine Reproduzierbarkeit der Messergebnisse gegeben; die alleinige mögliche Fehlerquelle lag somit hauptsächlich bei der Probenentnahme, die sich auf Grund des 3-Pasen-Systems während der Kultivierung zum Teil sehr schwierig gestaltete.

4.2 Mikrobielle Produktion

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Kultivierung von *Tsukamurella spec.* zu beschreiben und geeignete Bedingungen zu finden, die eine Überproduktion der mikrobiellen Glycolipide begünstigen.

Da *Tsukamurella spec.*, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, auf lipophilen Substraten ein sehr inhomogenes Wachstum zeigte, wurden die Untersuchungen im wesentlichen im Bioreaktormaßstab durchgeführt, bei der im Vergleich zu Schüttelkolbenexperimenten eine bessere Durchmischung, Nährstoff- und Sauerstoffversorgung sowie eine repräsentative Probenentnahme möglich war. Die Bildung von Zellaggregaten mit zunehmender Kultivierungsdauer, d.h. nach Abschluss der Wachstumsphase, wird auch bei anderen Organismen beschrieben, wie z.B. bei der Kultivierung von *Rhodococcus aurantiacus* 8001 oder *Rhodococcus erythropolis* auf n-Alkanen [RAMSAY et al., 1988; RISTAU, 1983].

Dieses Verhalten steht oftmals im Zusammenhang mit dem Mechanismus der Aufnahme von hydrophoben Substraten. Ein allgemeines Charakteristikum für Kohlenwasserstoff- und Triglycerid-aufnehmende Organismen ist die Veränderung der Zelloberfläche. Diese wird zunehmend lipophiler, so dass ein direkter Kontakt zwischen Zelloberfläche und Substrat möglich und die Anhaftung sowie die Diffusion des Substrates in die Zelle erleichtert wird [HOMMEL and RATLEDGE, 1993]. Durch die anschließend gebildeten Glycolipide, die ausgeschieden oder an der Zelloberfläche lokalisiert sind, wird die Phasengrenzfläche Öl/Wasser durch Emulsionsbildung vergrößert, was eine bessere Aufnahme der Substrate ermöglicht. So fördern z.B. Rhamnose- und Sophoroselipide das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida bombicola* auf lipophilen Substraten [ITOH et al., 1971, ITOH et al., 1982].

Schon in Voruntersuchungen konnte bei Schüttelkobenkultivierungen ein positiver Effekt einer EDTA-Zugabe ins Medium auf Wachstum, Produktbildung und Produktausschüttung bei *Tsukamurella spec.* beobachtet werden [HECKMANN, 1995; VOLLBRECHT, 1999]. Die Zugabe von EDTA in einer optimalen Konzentration von 0.25 g l⁻¹ reduzierte die Zellaggregatbildung und förderte die Ablösung der Glycolipide ins Medium; allerdings in Abhängigkeit von Biomasse, Glycolipidkonzentration und Substratkonzentration. Bioreaktorkultivierungen mit hohen Biomassekonzentrationen ergaben, dass keine vollständige Ablösung der Glycolipide von den Zellen bei dieser EDTA-Konzentration zu erzielen war. Auch der positive Einfluss auf das homogene Wachstum war bei hohen Biomasse- und Produktkonzentrationen nicht mehr gegeben, so dass es auch hier wieder zur Aggregatbildung kam. Eine Erhöhung der EDTA-Konzentration ergab zwar eine vollständige Ausschüttung ins Medium, hatte aber negativen Einfluss auf Wachstum und Produktbildung. So wurde der EDTA-Anteil von 0.25 g l⁻¹ zur erleichterten Produktausscheidung bei allen Kultivierungen eingesetzt; die Aufarbeitung des Produktes erfolgte allerdings unter Einbeziehung der Biomasse. Positive Effekte einer EDTA-Dosage auf die Sekundärmetabolit-Produktion sind ebenfalls bei *Rhodococcus erythropolis* bekannt [WAGNER, 1987; RISTAU, 1983], während bei *Pseudomonas spec.* DSM 2874 nur ein negativer Effekt beobachtet werden konnte [SYLDATK, 1984].

REEDY et al. [1982] und HISATSUKA et al. [1975] stellten einen Zusammenhang zwischen der verstärkten Emulgatorbildung und der Alkanaufnahme bei mit EDTA behandelten Zellen (*Pseudomonas spec.*) fest. Es wurde ein möglicherweise Calcium-abhängiges Protein postuliert, das einen lösungsvermittelnden Effekt auf das schwerlösliche Substrat (Alkan) ausübt. Weiterhin wird bei der Produktion von Rhamnoselipiden mit *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 eine Produktsteigerung durch die Limitierung von Mg-, Ca-, K-, Na-, Fe-Ionen sowie Spurenelementen erreicht [GUERRA-SANTOS et al., 1986]. SYLDATK und WAGNER [1987] beschreiben dahingehend eine Steigerung der Biotensidproduktion durch eine erhöhte Zugabe von Spurenelementen. Bei der Kultivierung von *Tsukamurella spec.* verursachte weder eine Limitierung oder Variation der genannten Ionen und Spurenelemente noch die Bereitstellung von Vitaminen einen Einfluss auf Wachstum oder Produktbildung (Ergebnisse nicht dargestellt). Der Stamm *Tsukamurella spec.* erwies sich von seinen Wachstumsbedürfnissen her als eher anspruchslos.

Ein Hauptansatzpunkt zur Steigerung der Produktausbeute bei *Tsukamurella spec.* war der bereits bekannte Einfluss der Phosphat- und Stickstoffkonzentration auf die gewünschte Überproduktion. Zwar wurde eine geringe Glycolipidproduktion auch schon in der Wachstumsphase von *Tsukamurella spec.* beobachtet; diese beschränkte sich allerdings hauptsächlich auf GL 1 und führte nur zu geringen Ausbeuten. Erst mit Erreichen der stationären Phase, eingeleitet durch eine Limitierung, erfolgte eine gesteigerte Produktion aller Glycolipide.

Ausgangspunkt für die hier durchgeführten Untersuchungen waren die Ergebnisse von Vollbrecht [1999]. Die beschriebenen Empfehlungen für eine gesteigerte Glycolipidproduktion mit *Tsukamurella spec.* lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Kultivierung mit ölsäurereichem Sonnenblumenöl
- Kultivierung als Fed-Batch
- Einleitung der stationären Phase durch N-Limitierung
- negativer Einfluss auf die Produktion durch hohe P-Konzentration

Stickstoff spielt bei vielen Organismen eine bedeutende Rolle für die Regulation der Sekundärmetabolit-Produktion. Von sowohl Hefen und Pilzen als auch von zahlreichen Bakterien ist bekannt, dass eine Stickstofflimitierung für die Glycolipidsynthese zwingend notwendig ist. Dies trifft z.B. auf die wegen ihrer hohen Produktausbeuten sehr gut untersuchte Hefe *Candida bombicola* zu [ASMER et al., 1988; DAVILA et al., 1992], ebenso auf *Candida antarctica* [KITAMOTO et al., 1993] und *Ustilago maydis* [SPÖCKNER et al., 1998; BOOTHROYD et al., 1956]. Als Beispiele für Bakterien lassen sich verschieden Vertreter der Gattungen *Rhodococcus*, *Nocardia* und *Pseudomonas* nennen [RISTAU und WAGNER, 1983; SYLDATK et al., 1984; ALVAREZ et al, 1997]. So ist der Synthesestart von Rhamnoselipiden in *Pseudomonas aeruginosa* nach Verbrauch der Stickstoffquelle und zu Beginn der stationären Wachstumsphase von vielen Autoren bestätigt worden [GUERRA-SANTOS et al., 1984; RAMANA and KARANT, 1989]. Bei ruhenden Zellen von *Pseudomonas sp.* DSM 2874 verursacht die Zugabe von Stickstoffquellen sogar eine Inhibierung der Rhamnoselipidbildung [SYLDATK et al., 1985]. Weitergehend ist ein direkter Einfluss der Stickstoffkonzentration auf die Expression von *Pseudomonas aeruginosa* Genen zur Rhamnoselipidsynthese zu beobachten [OCHSNER et al., 1995].

Ein ähnlicher Einfluss auf die Sekundärmetabolitbildung ist von zu hoher Phosphatkonzentration oder anderen Mediumbestandteilen bei vielen Organismen bekannt. So kann eine Phosphat-Limitierung ebenfalls wie die Stickstoff-Limitierung zur Repression oder Induktion von Enzymen, die im Sekundärmetabolismus involviert sind, erfolgen [RISTAU und WAGNER, 1983; KIM et al., 1990]. So wird z.B. ein negativer Einfluss von Phosphatpuffer auf die Glycolipidbildung bei *Ustilago maydis* beschrieben [FRAUTZ, 1986]; auch bei *Microbacterium spec.* wird die Glycoglycerolipidbildung durch zu hohe Phosphatmengen inhibiert [WICKE, 1999]. Dahingehend konnte bei *Candida bombicola* durch eine einsetzende Phosphatlimitierung eine verstärkte Sophoroselibidbildung beobachtet werden [ALBRECHT, 1997].

Da die Biotenside vornehmlich in der stationären Phase gebildet werden, war es naheliegend, Experimente mit ruhenden Zellen von *Tsukamurella spec.* durchzuführen. Wenn bei ruhenden Zellen über längere Zeit die Glycolipidbildungsaktivität der Zellen erhalten werden kann, bietet sich auch eine Mehrfachverwendung durch z.B. Immobilisierung der Zellen an, wie sie z.B. bei der Semi-kontinuierlichen Rhamnoselipid-Produktion mit *Pseudomonas sp.* sehr erfolgreich durchgeführt werden konnte [SYLDATK et al., 1984; KLEIN und WAGNER, 1987; SIEMANN und WAGNER, 1993].

Versuche mit ruhenden Zellen von *Tsukamurella spec.* im Schüttelkolbenmaßstab auf N+P-freiem Medium zeigten, dass 2.5 g l⁻¹ Glycolipid bei einem Ausbeutekoeffizienten von $Y_{P/S} = 0.2$ und $Y_{P/X} = 0.5$ isoliert werden konnten. Gleichzeitig wurde hierbei der negative Einfluss von Phosphat auf die Glycolipidproduktion beobachtet. Durch den Wegfall von Puffersubstanzen und die bessere pH-Konstanz, konnte im Bioreaktormaßstab eine Produktkonzentration von 4 g l⁻¹ bei $Y_{P/S} = 0.25$ und $Y_{P/X} = 0.5$ erzielt werden. Auch beim Einsatz immobilisierter Zellen wurde eine Glycolipidproduktion beobachtet. Sie lag allerdings durch das nicht wasserlösliche Substrat und der damit einhergehenden Diffusionslimitierung mit 1.1 g l⁻¹ Glycolipid und $Y_{P/S} = 0.19$ weit unter den Ausbeuten von freien ruhenden Zellen. Durch Optimierung der Arbeitsmethoden bei der Ernte der Zellen und bei der Herstellung der Immobilisate zur Verminderung des Infektionsrisikos wäre eine

Steigerung der Produktausbeute bei der Verwendung von ruhenden Zellen in Zukunft möglich.

Weitere Möglichkeiten, eine gesteigerte Überproduktion der Glycolipide unter limitierenden Bedingungen zu erreichen, sind mittels einer Zwei-Stufen-Kultivierung möglich. Nach der unlimitierten Wachstumsphase erfolgt die Produktion mit den gebildeten Zellen unter limitierten Bedingungen. Die unterschiedlichen Strategien zum Erreichen der Stickstoff- und/oder Phosphatlimitierung sind ausführlich in Abschnitt 3.3.3 dargestellt. Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die erzielten Konzentrationen und Ausbeutekoeffizienten der wichtigsten Bioreaktorkultivierungen.

Eine einfache Limitierung (entweder N- oder P-limitiert) erzwang zwar den Übergang in die stationäre Phase und damit die Produktion aller drei Glycolipidhauptgruppen allerdings nur bei sehr geringen Ausbeuten. Unter N-limitierten Bedingungen war z.B. mit ruhenden Zellen nur 1.5 gl^{-1} und unter P-limitierten Bedingungen im Bioreaktor nur 0.7 gl^{-1} Glycolipide zu erreichen. Die Synthese der Glycolipide wurde also sowohl durch zu hohe Phosphat- als auch Stickstoffkonzentration gestört.

Um die negativen Effekte einer restlichen P- und N-Konzentration während der Produktionsphase auszuschließen, wurden Kultivierungen mit Doppellimitierungen durchgeführt. Erreicht wurde dies zum einen durch sukzessive Zugabe von Stickstoff bzw. Phosphat, zum anderen durch gleichzeitigen Verbrauch beider Mediumsbestandteile während der Wachstumsphase. Die sukzessive Zugabe von Phosphat erwies sich im Gegensatz zur sukzessiven Zugabe von Stickstoff durch eine wesentliche Verlängerung der zweiten Wachstumsphase als nicht produktionsfördernd ($P_V = 0.004 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$). Bei weiteren Kultivierungen wurde durch den Einsatz eines geeigneten P/N-Verhältnisses ein gleichzeitiger Verbrauch beider Substanzen in der Wachstumsphase erreicht. Durch die Doppellimitierung und durch die Vermeidung mehrerer Wachstumsphasen konnte die Glycolipidausbeute auf 14 gl^{-1} und die Produktivität auf $P_V = 0.15 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$ gesteigert werden. Die Einführung einer weiteren Limitierung, in diesem Fall einer Sauerstofflimitierung, führte nicht zu einer weiteren Steigerung der Produktbildung.

Tabelle 4.2: Produktbildungsparamter ausgewählter Bioreaktorkultivierungen

Kultivierungsbedingungen	GL [g l ⁻¹]	BTM [g l ⁻¹]	$\Delta[S]$ [g l ⁻¹]	$Y_{P/X}$	$Y_{P/S}$	P_V^* [g l ⁻¹ h ⁻¹]
P-Limitierung durch kont. N-Zugabe (Abschnitt 3.3.3.1): SB-Öl, V _R 10l, Fed-Batch	0.7	n.b.	25	n.b.	0.028	0.005
P+N-Limitierung durch sukz. P-Zugabe (Abschnitt 3.3.3.2): SB-Öl, V _R 20l, Fed-Batch	1.1	11.0	30	0.10	0.036	0.004
P+N-Limitierung durch sukz. N-Zugabe (Abschnitt 3.3.3.3): SB-Öl, V _R 10l, Fed-Batch	10.5	22.5	43	0.47	0.240	0.120
P+N-Limitierung bei gleichzeitigen Verbrauch (Abschnitt 3.3.3.4) SB-Öl, V _R 20l, Fed-Batch	14.0	18.0	50	0.77	0.280	0.150
N+P-Limitiert + hohe Biomassekonz. als Batch (Abschnitt 3.3.5.2) SB-Öl, V _R 20l, Batch	22.5	40.0	130	0.56	0.170	0.280
Rapsölkultivierung (Abschnitt 3.3.6) V _R 20l, Batch, N+P-Limitiert	13.0	39.0	110	0.33	0.120	0.140
Calendulaölkultivierung (Abschnitt 3.3.6) V _R 5l, Batch, N+P-Limitiert	14.0	50.0	100	0.28	0.140	0.100

GL: Glycolipid; BTM: Biomasse; $\Delta[S]$: verbrauchtes Substrat

* Nach Erreichen der max. Glycolipidkonzentration

Neben den negativen Einflüssen von Stickstoff und Phosphat können auch andere Mediumsbestandteile, wie eine zu hohe Substratkonzentration oder ein zu hohe Produktkonzentration die Produktion negativ beeinflussen. Eine hohe Substratkonzentration (Sonnenblumenöl) wirkte sich in Schüttelkolbenkultivierungen, bedingt durch die schlechtere Durchmischung und eine damit verbundene schlechtere Sauerstoffversorgung, negativ auf Wachstum und Produktion aus. Bei Bioreaktorkultivierungen hatte eine von Anfang an hohe Substratkonzentration dagegen keinen negativen Einfluss. Durch Verdünnungsversuche konnte eine Produktrepression gegenüber der Glycolipidproduktion von *Tsukamurella spec.* beobachtet werden. Die Produktion konnte aber durch Verdünnung der Glycolipidkonzentration im Reaktor wieder eingeleitet werden. Da weiterhin kein

präzipitiertes Produkt während der Kultivierungen zu beobachten war und bei den erreichten Biomasse- und Produktkonzentrationen die Glycolipide trotz EDTA-Zugabe größtenteils zellassoziiert vorlagen (vgl. EDTA-Versuche, Kapitel 3.3.5.1 und Lösungsversuche, Kapitel 3.6.1), konnte eine Erhöhung der Produktausbeute nur durch eine Erhöhung der Biomassekonzentration erfolgen. Eine doppellimitierte Kultivierung bei gleichzeitiger Erhöhung der Biomasse und erfolgreicher Schaumunterdrückung durch Vorlage der gestamnten Substratkonzentration erbrachte eine maximale Glycolipidausbeute von 22.5 g l^{-1} . Zwar fiel hierbei $Y_{P/X}$ von 0.77, bedingt durch die nahezu Verdoppelung der Biomasse auf 0.56, aber die Produktivität konnte auf $P_V = 0.28 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (nach Erreichen der max. Glycolipidkonzentration; 80h) gesteigert werden. Die Glycolipidkonzentration ist somit abhängig von:

- der Konzentration der im Medium gelösten Glycolipide (wiederum abhängig von der Löslichkeit der Glycolipide und der EDTA-Konzentration), die wiederum direkt einen repressiven Einfluss auf die Produktion hat.
- von der Konzentration der zellassoziierten Glycolipide und damit von der Konzentration der Biomasse.

Weiterhin ist davon auszugehen, dass auch die zellassoziierte Glycolipidmenge in Bezug auf die vorhandene Biomasse ein Maximum besitzt, da sie nicht weiter ins Medium abgegeben wird und damit im Laufe der Kultivierung die gestamnte Zelloberfläche bedeckt. Zu Berücksichtigen ist hierbei auch der beobachtete Abbau der gebildeten Glycolipide durch *Tsukamurella spec.* selbst.

Eine weitere Erhöhung der Glycolipidproduktion könnte demnach durch die kontinuierliche Entfernung der Produkte während der Kultivierung (vgl. Kapitel 3.4.2) oder durch eine weitere Erhöhung der Biomassekonzentration erfolgen.

Die Produktion der Glycolipide erfolgte hauptsächlich in der stationären Phase. Genauerer Untersuchungen zur Biosynthese der Oligosaccharidlipide von *Tsukamurella spec.* sind allerdings noch nicht durchgeführt worden. Es existieren jedoch einige Arbeiten über die Biosynthese ähnlicher Glycolipide bei nah verwandten Organismen, z.B. verschiedenen *Rhodococcus*-Arten [LANG und PHILP, 1998], anderen glycolipidproduzierenden Bakterien [LANG und WULLBRANDT, 1998]

und Pilzen [KITAMOTO et al., 1998; ESDERS und LIGHT, 1971; HOMMEL und RATLEDGE, 1993; ALBRECHT, 1997], die Rückschlüsse über die ablaufenden Stoffwechselwege erlauben. Beim Einsatz von Pflanzenölen als alleinige C- und Energiequelle ist der erste Schritt des Abbaus eine Lipase-katalysierte Hydrolyse des Triglycerids in die freien Fettsäuren und Glycerin. Ein Teil dieser Fettsäuren wird durch vollständige β -Oxidation bis auf die Stufe des Acetyl-CoA abgebaut, im Citrat-Cyclus zu Malat umgesetzt und dann über Gluconeogenese zur Neusynthese der Zuckerbausteine verwendet. Die Kohlenwasserstoffketten des Lipidteiles können entweder aus Acetyl-CoA über einen Fettsäure-Synthetase-Komplex neu gebildet werden oder teilweise eventuell nach Modifikation direkt inkorporiert werden. Möglich ist auch, dass eine partielle β -Oxidation stattfindet, so dass in der Kettenlänge verkürzte Intermediate der β -Oxidation direkt ins Molekül eingebaut werden. Gerade der Weg der Inkorporation ist bei dem gefundenen GL 1 der Kultivierung auf Calendulaöl anzunehmen (Kapitel 3.3.6). Das Vorhandensein einer zweifach-ungesättigten oder zweier einfach-ungesättigter Fettsäuren als Acylreste lässt den Schluss zu, dass Intermediate der Calendularsäure direkt eingebaut wurden.

Die Verfolgung der prozentualen Zusammensetzung der Glycolipide über den Verlauf der durchgeführten Kultivierungen zeigte, dass GL 1 bereits in der exponentiellen Phase synthetisiert wurde. Anschließend folgten in der stationären Phase GL 2 und zuletzt GL 3. Diese Abfolge und die strukturelle Ähnlichkeit der Verbindungen ließ vermuten, dass GL 1 und GL 2 Intermediate auf dem Weg zur Synthese von GL 3 darstellen. Charakteristisch für die Zellwand von *Actinomyceten* [GOODFELLOW, 1992] sind langkettige Mycolsäuren, die mit Di- und Oligosacchariden wie z.B. Trehalose assoziiert sind. GL 1 und vor allem GL 1B stimmen im Substitutionsmuster mit diesen beschriebenen Zellwandbestandteilen überein. Dies weist darauf hin, dass die Bildung dieser Glycolipide in einem engen Zusammenhang mit der Zellwandsynthese stehen könnte und würde damit auch die Produktion in der Wachstumsphase erklären. Die Synthese scheint jedoch nicht streng wachstumsgekoppelt abzulaufen, da GL 1 auch in der stationären Phase weiterhin gebildet wurde. Sollte GL 1 wirklich eine der Vorstufen von GL 2 und GL 3 darstellen, dann müsste es aus diesem Grund sowieso in der stationären Phase weiterhin gebildet werden.

In Tabelle 4.3 sind die prozentualen Zusammensetzungen der Glycolipidgemische bei Abbruch der jeweiligen Kultivierungen dargestellt. Schon Vollbrecht [1999] beschreibt eine Veränderung der Produktzusammensetzung in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen. Bei der Produktion von Trehaloselipiden mit *Rhodococcus erythropolis* ist dieser Effekt ebenfalls bekannt [RISTAU, 1983; KRETSCHMER et al., 1982; RAPP et al., 1979; KIM et al., 1990]. Die Variation der einzelnen Glycolipidkonzentrationen ist nach Abbruch der Kultivierung nicht eklatant (außer bei der Calendulaöl als C-Quelle); im Mittel liegen alle Glycolipide in gleichen Verhältnissen vor. Während der Kultivierung waren allerdings, je nach den Bedingungen, die Unterschiede größer (vgl. Kapitel 3.3.3). Durch die Auswahl der Kultivierungsbedingungen und des Abbruchzeitpunktes konnte somit die Zusammensetzung des Glycolipidgemisches und damit auch seine physikochemischen (Kapitel 3.6) und biologischen (Kapitel 3.7) Eigenschaften variiert werden. Es besteht damit die Möglichkeit, schon während der Kultivierung das Produkt auf den späteren Verwendungszweck abzustimmen.

Tabelle 4.3: Prozentuale Zusammensetzung der Glycolipidgemische bei Abbruch der Kultivierung.

Kultivierungsbedingungen	GL 1 [%] (nativ)	GL 2 [%]	GL 3 [%]
P-Limitierung durch kont. N-Zugabe (Abschnitt 3.3.3.1)	33	32	35
N-Limitierung durch sukz. P-Zugabe (Abschnitt 3.3.3.2)	35	36	29
P+N-Limitierung durch sukz. N-Zugabe (Abschnitt 3.3.3.3)	22	38	40
P+N-limitierung durch gleichzeitigen Verbrauch (Abschnitt 3.3.3.4)	33	32	35
N+P-Limitiert + hohe Biomassekonz. als Batch (Abschnitt 3.3.5.4)	33	33	33
Rapsölkultivierung (Abschnitt 3.3.6)	33	33	33
Calendulaölkultivierung (Abschnitt 3.3.6)	15	24	61

An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, dass bei der Kultivierung auf Calendulaöl im Vergleich zu Sonnenblumen- und Rapsöl eine Änderung des Lipidmusters und der Produktzusammensetzung (mehr GL 3) beobachtet werden konnte. Dieser Effekt, bewirkt durch die Änderung des Substratangebotes, wird auch bei anderen Organismen wie *Ustilago maydis* oder *Candida bombicola* beschrieben [BRAKEMEIER, A., 1997; SPÖCKNER et al., 1999; MANZKE, C., 1998].

4.3 Modifikation der nativen Glycolipide

Neben der gezielten Übertragung von Fettsäuren oder Fettalkoholen auf Kohlenhydrate oder deren Derivate ist die Modifizierung von nativen Glycolipiden zur Gewinnung von neuen Biotensiden für die chemische Industrie (Kosmetika, Pflanzenschutzmittel) von großem Interesse. Im Laufe der letzten 20 Jahre wurde die Verwendung von Biokatalysatoren eine immer attraktivere Alternative zu konventionellen chemischen Methoden [BORNSCHEUER et al., 1999, 2000]. Da Enzyme häufig sehr chemo-, regio- und enantioselektiv reagieren, sind sie für die pharmazeutische Industrie besonders attraktiv, da hier das Interesse an enantiomerenreinen und spezifisch funktionalisierten Verbindungen kontinuierlich wächst. Außerdem werden enzymkatalysierte Reaktionen in der Regel unter milden Bedingungen durchgeführt, etwa bei Raumtemperatur und bei neutralem pH, was die Gefahr von Produktisomerisierung, -racemisierung und -epimerisierung minimiert.

Glycolipide gewinnen in den letzten Jahren eine zunehmende Bedeutung als bioaktive Wirkstoffe in der pharmazeutischen Forschung. Beispielsweise zeigen sie zahlreiche viel versprechende antitumorale Wirkungen, die in Zukunft in der Krebsprävention eine große Rolle spielen könnten [MATSUFUJI et al., 2000; COLOMBO et al., 1999; ISODA et al., 1996, 1997]. Daher wird es in Zukunft von immer größerer Bedeutung sein, die bioaktive Wirkung der Glycolipide durch gezielte enzymatische Modifikation zu steigern. Als Biokatalysatoren werden für diese Aufgaben seit Mitte der 80er Jahre neben Proteasen und Glycosidasen bevorzugt Lipasen eingesetzt, deren Fähigkeit, Triglyceride in wässrigen Medien zu hydrolysieren, schon viel länger genutzt wird. In organischen Lösemitteln katalysieren sie dagegen unter nahezu wasserfreien Bedingungen die Rückreaktion. Außerdem ermöglichen organische Lösemittel die Solubilisierung hydrophober Substrate, leichtere Produktisolierung und

leichtere Zurückgewinnung des unlöslichen. Beispielhaft für die enzymatische Acylierung der Kohlenhydrate seien zunächst die bahnbrechenden Arbeiten von Klibanov [KLIBANOV et al., 1986] und Colombo [COLOMBO et al., 1999, 1998] genannt.

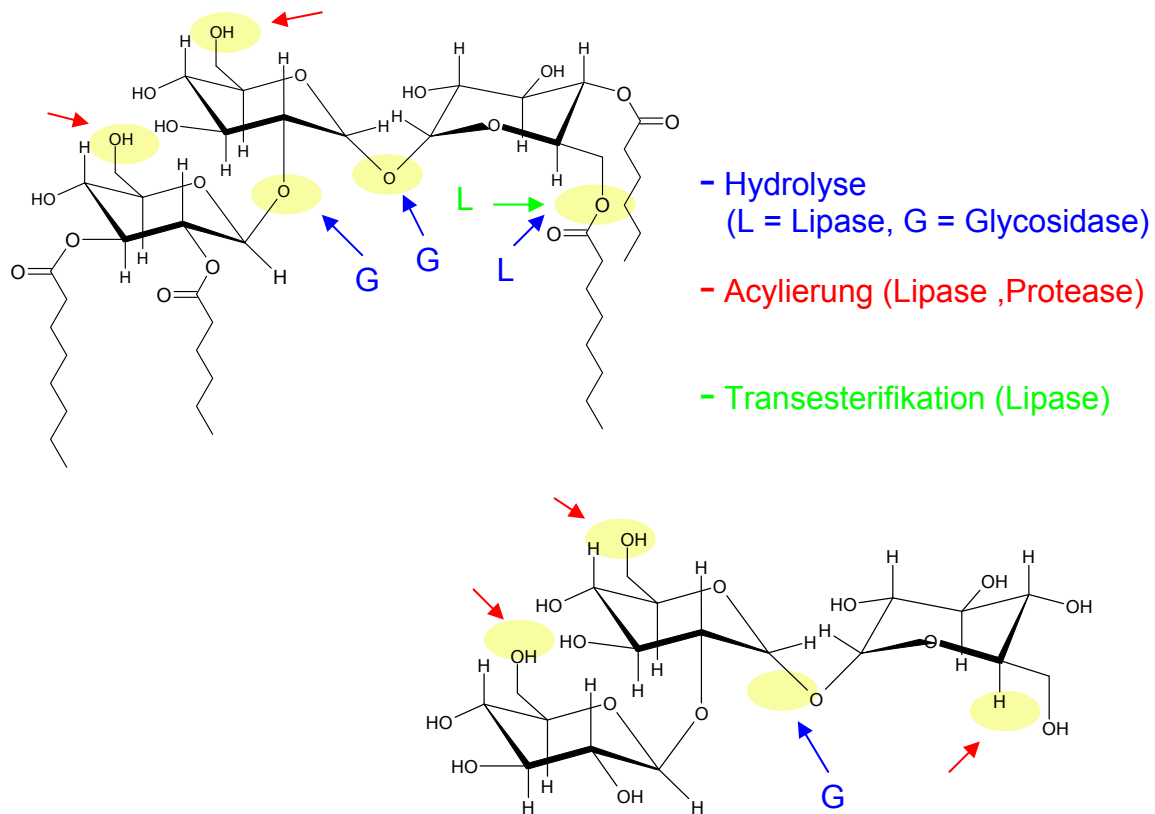


Abbildung 4.1: Mögliche enzymatische Modifikationen am Beispiel des Glycolipids GL 2 und dessen Zuckergrundgerüst G 2.

In Abbildung 4.1 sind am Beispiel von GL 2 und dessen Zuckergrundgerüst G 2 mögliche enzymatische Modifikationen mittels Lipasen, Glycosidasen und Proteasen dargestellt. In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Modifikationsexperimenten durchgeführt; die wichtigsten sind in Abschnitt 3.5 beschrieben.

Hydrolyse der Glycolipide

Die Darstellung der Zuckergrundgerüste G1, G2 und G3 durch alkalische Verseifung war, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, möglich. Die enzymatische Hydrolyse der nativen Glycolipide im wässrigen führte dagegen nur bei GL 1 zur Umsetzung und

zwar zum vollständig hydrolysierten G 1 (Trehalose). Dabei wurden keine Nebenprodukte beobachtet, obwohl Lipasen bevorzugt die Primärgruppen hydrolysieren und sich bei GL 1 nur ein Acylrest an dieser Position befindet. GL 2 und GL 3 wurden nicht als Substrat akzeptiert. Das aktive Zentrum von Lipasen wird als taschenförmige Struktur, versehen mit einem Deckel (engl.: lid), beschrieben. Lipasen hydrolysieren die Esterbindung an einer Öl/Wasser-Grenzfläche. Bevorzugt hydrolysieren sie dabei wasserunlösliche Triglyceride. Dabei kommt es zu einer Grenzflächenaktivierung. Isolierte Enzyme zeigen gewöhnlich eine geschlossene Konformation, bei der der Deckel über dem aktiven Zentrum der Lipase geschlossen vorliegt. Beim Enzym-Substrat-Komplex erfolgt eine Konformationsänderung. Der Deckel ist geöffnet und erlaubt einen Zugang zum aktiven Zentrum. Diese Beobachtung ließ den Schluss zu, dass die Grenzflächenaktivierung durch Lipid-induzierte Veränderung der Deckelkonformation ermöglicht wird [BRADY et al., 1990; GROCHULSKI et al., 1993; WINKLER et al., 1990; SCHMIDT, U., 2000]. Gegen wasserlösliche Substrate zeigen Lipasen eine schlechte Aktivität, da der Deckel über dem aktiven Zentrum der Lipase geschlossen bleibt. Bei Bindung an eine hydrophobe Oberfläche öffnet sich der Deckel und die katalytische Aktivität der Lipase erhöht sich. Aus diesem Grund wurden weitere Hydrolyseversuche an GL 2 und GL 3 in Wasser/Lösungsmittel-Gemischen durchgeführt. So beschreibt Ramm [RAMM, 2001] z.B. die erfolgreiche Hydrolyse von Glycoglycerolipiden in wasserarmen polaren organischen Lösungsmitteln. Die Hydrolyse von Phospholipiden kann ebenfalls in organischen Lösemitteln durchgeführt werden. Die besten Ausbeuten wurden hierbei in wasserarmen Butanol oder t-Amylalkohol erhalten [HAAS et al., 1993]. Bei GL 2 und GL 3 führte dies jedoch nicht zu einer Umsetzung. Es ist zu vermuten, dass die beiden Glycolipide aufgrund ihrer Größe nicht von den Lipasen als Substrat akzeptiert wurden. Sie zählen so mit einem berechneten HLB Wert über 10 eher zu wasserlöslichen Substanzen. Damit zählen sie nicht zu den bevorzugten Substraten der Lipasen.

Neben Lipasen besitzen auch Esterasen, Phospholipasen und andere extrazelluläre Enzyme Hydrolase-Aktivität. Esterasen hydrolysieren im Gegensatz zu Lipasen eher kurzkettige, wasserlösliche Substrate (BROCKERHOFF and JENSEN, 1974). Aber auch hier konnte keine Umsetzung von GL 2 und GL 3 beobachtet werden. Bei der Inkubation von GL 3 mit einer Naringinase aus *Penicillium decumbens* konnte dahingegen eine Hydrolyse der Galactoseeinheit und somit eine Darstellung von GL

2 aus GL 3 erreicht werden. Dies konnte auf die Fremd-Glycosidase-Aktivität der Naringinase [SHILVOK, J.P. et al., 1999] zurückgeführt werden. Eine Bestätigung dieser Hydrolyse ergab eine Umsetzung mit β -Galactosidasen.

Acylierung der nativen Glycolipide

Bei der Lipase-katalysierten Acylierung der Glycolipide GL 2 und GL 3 mit verschiedenen Fettsäuren in organischen Lösungsmittel konnte eine Vielzahl von neuen Glycolipiden detektiert werden. Der Ansatz mit GL 3 + Ölsäure in MTBE, mit dem Enzym Novozyme 435 bei 55°C und dem Zusatz von 40 mg ml⁻¹ Molsieb ergab eine 95%ige Umsetzung in die beiden Glycolipide GL 3-Ölsäure1 und GL 3-Ölsäure2.

Das Produktverhältnis lag mit 5:1 auf der Seite des einfach acylierten GL 3-Ölsäure1. Die Struktur des GL 3-Ölsäure2 konnte nicht genau geklärt werden; aber auf Grund seines R_F -Wertes und der NMR-Ergebnisse ist anzunehmen, dass es das doppelt acylierte Folgeprodukt von GL 3-Ölsäure1 darstellt. Das Temperaturoptimum hinsichtlich der Ausbeute lag bei 55°C. Höhere Temperaturen veränderten zwar das Produktverhältnis, verschlechterten aber gleichzeitig die Ausbeute. Die Wahl des Lösungsmittels war abhängig von der Solubilisierung der Edukte und der Hydrophobie des Lösungsmittels. Die Enzymaktivität in hydrophoben Solventien ist höher als in hydrophilen; LAANE et al. [1987] fanden, dass eine direkte Korrelation zwischen der Aktivität und der Hydrophobie des Lösungsmittels, ausgedrückt als log P-Wert, besteht. MTBE und t-Amylalkohol sind hydrophober als die anderen getesteten Lösungsmittel und die Löslichkeit der Glycolipide beträgt zwischen 95-100%. Damit sollten sie das optimale Lösemittel für die enzymatische Acylierung der nativen Glycolipide darstellen. Ein weiterer Faktor für die Umsetzung ist der Wassergehalt des Lösungsmittels. Zum Erreichen einer hohen Enzymaktivität muss der Wassergehalt des Lösungsmittels umso höher sein, je hydrophiler das Lösungsmittel ist [CARRERA et al., 2000]. Dies liegt daran, dass nicht der Wassergehalt des Lösungsmittels für die Aktivität zählt, sondern der Wassergehalt des Enzyms. Daher ist der Einfluss organischer Lösemittel auf ein Enzym in erster Linie auf Wechselwirkungen mit der enzymgebundenen essentiellen Wasserschicht und nicht auf Wechselwirkungen mit dem Enzym selbst zurückzuführen. Um das gleiche Maß an Konformationserhaltung, d.h. die gleiche Wasseraktivität am Enzym zu erreichen, ist in einem hydrophoben Lösemittel weniger Wasser erforderlich als in

einem hydrophilen. Das hat für das relativ hydrophobe Lösemittel MTBE zur Folge, dass die Enzymaktivität der Lipase durch eine geringe Zunahme des Wassergehalts gesteigert werden könnte. Dies war jedoch nicht der Fall. Vielmehr setzte sich mit zunehmendem Wassergehalt die Rückreaktion der enzymatischen Hydrolyse durch. Eine Erhöhung der Produktausbeute konnte daher durch die Entfernung des bei der Esterbildung entstehenden Wassers durch den Einsatz von aktiviertem Molsieb erreicht werden. Das Optimum lag hier bei 40 mg ml^{-1} . Eine weitere Erhöhung verringerte die Ausbeute, da das zur Hydratisierung des Enzyms benötigte Wasser ebenfalls entzogen wurde.

Auffallend war weiterhin die hohe Instabilität der neu dargestellten Glycolipide. Sowohl GL 3-Ölsäure1 als auch GL 3-Ölsäure2 waren nur sehr schwer zu isolieren und zerfielen bei zu hoher Temperatur- oder Druckbelastung sowie in Anwesenheit von Kieselgel und Spuren von Wasser. Anzunehmen ist, dass hierfür sterische Gründe verantwortlich sind. Die nativen Glycolipide scheinen die stabilste Form darzustellen, denn, obwohl sie primäre Hydroxylgruppen besitzen, werden sie durch das Enzymsystem von *Tsukamurella spec.* nur bis zum bekannten Grad acyliert. Zumindest sind keine weiteren Produkte nachweisbar.

Acylierung der Zuckergrundgerüste

Bei der Lipase-katalysierten Acylierung der Zuckergrundgerüste G 2 und G 3 mit verschiedenen Fettsäuren in organischen Lösungsmittelgemischen konnte eine Vielzahl von neuen Glycolipiden detektiert werden (nicht alle Umsetzungen sind in Kapitel 3.5.4 dargestellt). Der Ansatz mit G 3 + Ölsäure in MTBE/Pyridin (4:6,v/v), der Lipase Novozyme 435 bei 55°C und dem Zusatz von 40 mg ml^{-1} Molsieb lieferte die drei Glycolipide G 3-Ölsäure1, G 3-Ölsäure2 und G 3-Ölsäure3. Bei der Reaktion handelt es sich um eine mehrstufige Gleichgewichtsreaktion. Die Strukturen von G 3-Ölsäure2 und G 3-Ölsäure3 konnten zwar nicht aufgeklärt werden, aufgrund ihrer R_F -Werte lässt sich aber annehmen, dass sie zum einen ein Zwischenprodukt und zum anderen ein Folgeprodukt des vierfach acylierten Hauptproduktes G 3-Ölsäure1 darstellen. G 3-Ölsäure1 stellt, bezogen auf sein Substitutionsspektrum, ein natives GL 3 mit Ölsäure als alleinige Lipidkomponente dar. Die Instabilität der beiden Nebenprodukte lässt den gleichen Schluss zu, wie er schon bei Acylierung der nativen Glycolipide formuliert wurde. GL 3-Ölsäure1 ähnelt dem nativen Glycolipid, welches wiederum den stabilsten Zustand beschreibt. Niedriger oder höher acylierte

Glycolipide mit dem Zuckergrundgerüst G 3 sind auch beim Organismus *Tsukamurella* spec. nicht zu identifizieren und stellen anscheinend einen wesentlich instabileren Zustand dar. Auch die Art des Substitutionsmusters der nativen Glycolipide muss den stabilsten Zustand beschreiben. Denn es werden bei der enzymatischen Modifizierung nicht ausschließlich nur die von Lipasen bevorzugten primären Hydroxylgruppen am Zuckergrundgerüst acyliert sondern auch sekundäre, entsprechend dem Vorbild aus dem Organismus.

Die Schwierigkeit bei der enzymatischen Acylierung von hydrophilen Substanzen, wie den Zuckergrundgerüsten, besteht in der Solubilisierung der Edukte bei gleichzeitiger Aktivitätserhaltung des Enzyms. Nur in polaren Lösungsmitteln wie Pyridin und DMSO waren sie überhaupt löslich. Allerdings konnte unter diesen Bedingungen kein Umsatz beobachtet werden. Auch die Erhöhung der Löslichkeit der jeweiligen Zucker durch den Einsatz von Phenylborsäure führte nicht zum Erfolg. Erst der Einsatz von Lösemittelgemischen, die die jeweiligen Eigenschaften, Solubilisierung und ein geeigneter Log P in Bezug auf die Enzymaktivität, vereinten, führte zu der beschriebenen Acylierung [DEGN and ZIMMERMANN, 2001].

4.4 Physikochemische Eigenschaften

Wie in Kapitel 3.3 dargestellt, setzt sich die zu erreichende Glycolipidkonzentration aus der Konzentration im Medium und der zellassoziierten Glycolipidmenge zusammen. Da während der Kultivierung kein Glycolipid ausfällt, ist die Menge der sich in Lösung befindenden Glycolipide auch von deren Löslichkeit abhängig. In den hier dargestellten Kultivierungen konnte keine Konzentration oberhalb der Löslichkeitsgrenze beobachtet werden. Dies ist im Gegensatz zu z.B. Sophoroselipiden, deren Löslichkeit in Wasser wesentlich geringer ist, die aber im Laufe einer Kultivierung präzipitieren.

Die in dieser Arbeit isolierten Glycolipide und Glycolipidgemische zeigen aufgrund ihrer molekularen Zusammensetzung, d.h. aufgrund des gleichzeitigen Vorliegens eines hydrophilen und eines hydrophoben Bereiches innerhalb eines Moleküls, einen amphiphilen Charakter und sind somit grenzflächenaktive Substanzen.

Aus Tabelle 3.29 lässt sich entnehmen, dass die untersuchten Glycolipide sehr unterschiedliche physikochemische Eigenschaften zeigten. Mit GL 1 ließ sich eine minimale Oberflächenspannung von 26 mN m^{-1} erreichen, während mit GL 2, GL 3 und den modifizierten Glycolipide GL 3-Ölsäure1 und GL 3-Pentensäure1 deutliche geringere Werte von 23 und 24 mN m^{-1} erzielt werden konnte. Gleichzeitig zeigten die Glycolipide GL 1 und GL 1b den niedrigsten gemessenen cmc-Wert im Bereich von $1.24 \cdot 10^{-5}$ und $2.13 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Alle anderen vermessenen Glycolipide zeigten hier Werte, die etwa eine Zehnerpotenz höher bei Werten zwischen $8.98 \cdot 10^{-5}$ und $16.75 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ lagen. Untersuchen haben gezeigt, dass mit zunehmender Größe des hydrophoben Restes von Tensiden sich deren kritische Micellbildungskonzentration und deren minimale Oberflächenspannung erniedrigt [TRAUBE, 1981]. Zwar besitzen die höhersubstituierten Glycolipide GL 2, GL 3 sowie die modifizierten Glycolipide einen großflächigeren lipophilen Molekülanteil und erniedrigen die Oberflächenspannung dementsprechend auch besser, aber ihr cmc-Wert liegt wesentlich höher als z.B. bei GL 1 mit seinem geringeren lipophilen Charakter. Dieser Effekt ist von mehrkettigen Tensiden bekannt. Durch eine Zusammenlagerung der Alkylketten kommt es zu einer Abschirmung der hydrophoben Bereiche von den Wassermolekülen, so dass im Vergleich mit einkettigen Tensiden eine geringere Oberflächenaktivität beobachtet wird [HOFFMANN und ULBRICHT, 1993]. Eine Erhöhung der Hydrophobie durch längere oder voluminösere Ketten führt im allgemeinen zu einer Absenkung der kritischen Micellbildungskonzentration [HERZFELD, 1952]. Bei den hier untersuchten mehrkettigen Glycolipiden trifft dieser Effekt jedoch nicht zu. Wie bei verzweigten Kohlenwasserstoffresten wird bei mittel- oder endständiger Position des Alkylrestes am hydrophilen Molekülteil die "wirksame Kettenlänge" der Acylgruppen gegenüber der Summe der vorliegenden Kohlenwasserstoffketten erniedrigt.

Die untersuchten Gemische von Glycolipiden (GL 1 Gemisch, natives GL-Gemisch) stellen in ihren Eigenschaften die Summe ihrer Einzelkomponenten dar. Es zeigt sich, dass ihr technischer Einsatz ohne aufwendige Aufreinigungsschritte in die einzelnen Komponenten sinnvoll ist.

Ein Vergleich mit bekannten Glycolipiden zeigt, dass besonders GL 2, GL 3 und die modifizierten Glycolipide auffällig niedrige Oberflächenspannungen erreichen, wie sie bisher nur von einigen Rhamnoselipiden ($25\text{-}30 \text{ mN m}^{-1}$) bekannt waren [PATEL and DESAI, 1997, GEORGIU et al., 1992].

Eine weitere physikochemische Eigenschaft von Tensiden besteht in ihrem Emulgiervermögen. Grundsätzlich können alle Tenside auch als Emulgatoren verwendet werden. Die Wahl des Emulgators richtet sich dabei nach den zu emulgierenden Phasen und nach dem Anwendungszweck der Emulsion. Nach Griffin lässt sich das Emulgierverhalten eines Tensids anhand des Verhältnisses von hydrophilen und hydrophoben Molekülanteilen bestimmen (vgl. Kapitel 2.7.2). Dieses Verhältnis kann mit dem HLB-Wert beschrieben werden.

Die experimentelle Bestimmung des HLB-Wertes lieferte gegenüber den berechneten Werten einige Abweichungen. Bis auf GL 2 und die modifizierten Glycolipide werden von den untersuchten Tensiden Substanzen mit einem HLB-Wert zwischen 7 und 9 optimal emulgiert. GL 2, GL 3-Ölsäure1 und GL 3-Pentensäure1 zeigen dagegen einen Wert von 10-11 und gehören damit eher zu den wasserlöslichen Tensiden. Dies könnte z.B. auf sterische Effekte zurückzuführen sein. Das HLB-System trifft eine Aussage über das molare Verhältnis von hydrophilen zu hydrophoben Molekülanteilen. Die Emulgatorgeometrie und strukturelle Besonderheiten werden dabei nicht berücksichtigt. Obwohl GL 2 und GL 3 in ihrer Struktur aufeinander aufbauen, verändert anscheinend die Einführung einer weiteren Zuckereinheit, der Galactose, die Emulgationseigenschaften des Moleküls drastisch. Und auch die Einführung weiterer hydrophober Molekülanteile, wie bei GL 3-Ölsäure1 und GL 3-Pentensäure1, führte nicht wie erwartet zu einem geringeren sondern zu einem höheren HLB-Wert im Verhältnis zu dem nativen GL 3.

Das ins Medium ausgeschiedene native Glycolipidgemisch ($HLB_{exp} = 8$) erlaubt, das als Substrat eingesetzte Sonnenblumenöl ($HLB = 8$) optimal zu emulgieren und damit die Substrataufnahme zu erleichtern.

4.5 Biologische Eigenschaften

Glycolipide sind als Zellmembranbestandteile sowohl in Bakterien, Pilzen, Algen und höheren Organismen vertreten. Dort sind sie zwar nur in relativ geringen Konzentrationen vorhanden, übernehmen aber wichtige Funktionen bei zellulären Interaktionen, wie z.B. bei der Regulation von Zellwachstum, Adhäsion und Zelldifferenzierung. Da sie verstärkt in Nervenzellen nachgewiesen werden können,

wird weiterhin eine Funktion im Zusammenhang mit der Leitung von Nervenimpulsen vermutet.

Auch ungewöhnliche Zuckerbausteine wie die hier untersuchten G 2- und G 3-Zuckergrundgerüste können für pharmazeutische Anwendungen interessant sein. So wurde unlängst als weitere Zielstruktur für die Wirkstoffsynthese das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^X identifiziert [GIANNIS et al., 1994]. Es dient als schwach-affiner Ligand und als Segment natürlicher Liganden von Adhäsionsrezeptoren, die bei der Erkennung von Leukozyten und Endothel-Zellen eine wichtige Rolle spielen. Dieser Vorgang ist wichtig innerhalb des komplexen Vorgangs, der bei akuten Entzündungen im Gewebe stattfindet. Der Einsatz von Sialyl-Lewis^X-Analoge zeigt hierbei entzündungshemmende Wirkung.

Ergebnisse zur biologischen Aktivität von Glycolipiden gegenüber Bakterien, Pilzen und Algen sind vielfach beschrieben worden [HAFERBURG et al., 1986; LANG und WAGNER, 1993]. Alle der hier untersuchten Biotenside zeigten antimikrobielle Wirkung gegenüber einigen Gram-positiven und auch Gram-negativen Bakterien und dem Pilz *Ustilago violacea* (Tabelle 3.31). Auch die Alge *Chlorella fusca* wurde von einigen der getesteten Glycolipide in ihrem Wachstum gehemmt. Die beiden modifizierten Glycolipide GL 3-Ölsäure1 und GL 3-Pentensäure1 besaßen hierbei das größte Potential. Dies zeigt, dass durch die Modifizierung von Leitstrukturen deren Aktivität positiv beeinflusst werden kann.

Immer interessanter wird die Wirkung von Biotensiden auf tierische und menschliche Zellen bzw. Zelllinien. So ist eine der lebensnotwendigen Aufgaben des Immunsystems von Säugetieren der Schutz vor Infektionen. Dies gelingt durch ein Netzwerk von Interaktionen verschiedenen lymphoider und phagozytierender Zellen über Bildung und Freisetzung mehrerer Aktivierungs-, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Lockstoff [1991] synthetisierte z.B. Glycosylamide, die bei der primären humoralen Immunantwort (Synthese von Antikörpern der Klasse IgM) von Milzzellkulturen (Maus) auf Schafserythrozyten als Antigene eine dosisabhängige Steigerung der Zahl antikörperbildender Zellen induzierten.

Des weiteren wurde das Trehalose-6,6'-dimycolat (TDM, Cord-Faktor) von Mycobakterien, Nocardien und Rhodococci einerseits als toxisches Glycolipid in Verbindung mit der Tuberkulose-Infektion betrachtet [GOREN, 1972], andererseits

konnten immunmodulierende Aktivitäten gegenüber Leukämiezellen und Grippeviren beobachtet werden [LECLERC et al., 1976, AZUMA et al., 1988]. Auch antitumorale Wirkungen sind beschrieben worden. So induzierten Trehalosedimycolate die Entwicklung von tumorlytischen Aktivitäten [GRAND-PERRET et al., 1986] bei Macrophagen und erhöhten die Resistenz gegenüber spezifischen Tumorarten [BEKIERKUNST et al., 1971; NISHIKAWA et al., 1977].

Die den *Tsukamurella*-Produkten vergleichbaren Glycolipide, wie Rhamnoselipide, Sophoroselipide, Succinoyltrehaloselipide und Mannosylerythritollipide hemmten das Wachstum von verschiedenen Tumorzell-linien und induzierten die Differenzierung von promyelocytischen Leukämiezellen [ISODA et al., 1995, 1996, 1997]. Eine wichtige Rolle für den Wirkmechanismus dieser Substanzen schien die Hemmung von spezifischen Proteinkinase-C-Aktivitäten zu spielen. Diese sind maßgebend an der Regulation von Wachstum, Teilung und Differenzierung von Zellen beteiligt und werden in einigen Tumorarten überexprimiert. Die Hemmung und Aktivierung einer Reihe von für die Tumorbildung relevanten Proteinkinasen durch die Glycolipide GL 1, GL 2 und GL 3 sowie durch das Tetrasaccharid G 3 wurde deshalb untersucht (Tabelle 3.33). Die Ergebnisse zeigten, dass keine spezifische Hemmung oder Aktivierung einer einzelnen Kinase vorlag, statt dessen wurde ein weites Spektrum an Proteinkinasen signifikant gehemmt. Diese Daten geben erste Hinweise darauf, dass diese Verbindungen als antitumorale oder immunstimulierende Reagenzien wirksam sein können.

Eine viel versprechende antitumorale Wirkung ergab auch die Untersuchung auf Anti-Tumor-Promoting-Aktivität durch Inhibierung der durch TPA induzierten Aktivierung eines frühen Antigens des Epstein-Barr-Virus (EBV-EA). Alle eingesetzten Verbindungen (Tabelle 3.34) inhibierten das EBV-EA und verhinderten damit die Aktivierung der Viren und das Absterben der Testzelllinie. Die höchste antitumorale Aktivität wies dabei das Glycolipid GL 1 und das Tetrasaccharid G 3 auf. Gleichzeitig wiesen alle eingesetzten Substanzen Überlebensraten der Raji-Zellen (EBV-Genom tragende menschliche lymphoblastische Zellen) von 60% bis 80% auf. Dieser Zusammenhang ist von entscheidender Bedeutung, da für den therapeutischen Einsatz einer Substanz neben der eindeutigen Wirksamkeit auch eine gute Verträglichkeit erforderlich ist. Ähnliche Untersuchungen zur Wirkung verschiedener Glycoglyceride [COLOMBO et al., 1996] zeigten, dass Galactosylglycerine im Vergleich zu Glucoglycerinen eine höhere Aktivität besitzen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Optimierung der mikrobiellen Produktion von Glycolipiden auf der Basis nachwachsender Rohstoffe durch den Stamm *Tsukamurella spec.*, weiterhin mit deren Isolierung und Charakterisierung sowie deren enzymatischen Modifikationen.

Durch den Einsatz des neu entwickelten HPLC-gestützten Analyseverfahrens konnte die Produktion der Glycolipide fehlerminimiert über den gesamten Verlauf der einzelnen Kultivierungen verfolgt werden. Bei Verwendung von ölsäurereichem Sonnenblumenöl als C-Substrat gelang es, die Ausbeute der drei nativen Glycolipide GL 1, GL 2 und GL 3 von 1 g l^{-1} im Schüttelkolbenmaßstab auf 22.5 g l^{-1} im Bioreaktormaßstab zu steigern. Voraussetzung für eine gesteigerte Überproduktion war dabei eine gleichzeitige Doppellimitierung von Phosphat und Stickstoff. Ein Zusatz von 0.25 g l^{-1} EDTA zum Medium führte dabei zu einer Verbesserung des Wachstumsverhaltens. Allerdings konnte damit nicht eine vollständige Ablösung des Produkts von der Biomasse erreicht werden. Es zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der maximal erreichbaren Produktausbeute und der im Medium gelöst vorliegenden Produktkonzentration (Produktinhibierung, Produktlöslichkeit, EDTA-Konzentration) sowie der erreichten Biomassekonzentration. Als optimal erwies sich hierbei die Kultivierung als Batch (zur Verhinderung eines Biomasseverlusts durch Überschäumen) und eine hohe Biomassekonzentration (da die Glycolipide zum größten Teil zellassoziiert vorlagen). Untersuchungen zur Kinetik der Glycolipidbildung zeigten, dass GL 1 bereits in der exponentiellen Wachstumsphase gebildet wurde, während GL 2 und GL 3 erst nach Erreichen der stationären Phase verstärkt ins Medium ausgeschieden wurden. Damit war es möglich, durch Auswahl der Kultivierungsbedingungen und des Erntezeitpunktes die Zusammensetzung des Glycolipidgemisches und damit auch seine physikochemischen und biologischen Eigenschaften zu variieren. Weiterhin war durch Variation des Substrates (vgl. Calendulaöl) ebenfalls eine Änderung in der Zusammensetzung des Glycolipidgemisches sowie eine Änderung der Lipidzusammensetzung von GL 1 zu beobachten.

Durch enzymatische Modifikation konnten aus GL 3 die neuartigen Glycolipide GL 3-Ölsäure¹ und GL 3-Pentensäure¹ dargestellt werden. Weiterhin gelang die enzymatische Acylierung des Zuckergrundgerüsts G 3 zu dem neuartigen Glycolipid G 3-Ölsäure¹. Es zeigte sich, dass das Substitutionsmuster der nativen Glycolipide aus *Tsukamurella* spec. sterisch die stabilste Anordnung aufwiesen. Die durch enzymatische Modifikation dargestellten höher- oder niedriger-acylierten Verbindungen waren dagegen relativ instabil. Weiterhin gelang durch den Einsatz von β -Galactosidasen eine enzymatische Hydrolyse von GL 3 zu GL 2. Durch die Modifikation konnten die biologischen und die physikochemischen Eigenschaften der nativen Glycolipide beeinflusst werden.

Zur Charakterisierung ihrer physikochemischen Eigenschaften wurden die einzelnen nativen und modifizierten Glycolipide sowie deren Gemische auf ihre Fähigkeit, die Oberflächenspannung von Wasser zu erniedrigen, überprüft. Alle untersuchten Verbindungen waren, auch im Vergleich zu bisher bekannten Kohlenhydrat-Tensiden, hochgradig oberflächenaktiv. So erniedrigten GL 2, GL3-Ölsäure¹ und GL3-Pentensäure¹ die Oberflächenspannung von 72 mN m^{-1} auf 23 mN m^{-1} bei cmc-Werten von 100 bis 200 mg l^{-1} .

Weiterhin zeigten die Glycolipide antimikrobielle Wirkung besonders gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie gegen den Pilz *Ustilago violacea*. Auch hier konnte eine verstärkte Wirkung bei den modifizierten Verbindungen beobachtet werden. Weiterhin konnte die Inhibierung einer Reihe von für die Tumorbildung relevanten Proteinkinasen sowie weitere antitumorale Wirkungen nachgewiesen werden.

6 ANHANG

6.1 Tabellen mit spektroskopischen Daten

Auf den folgenden Seiten sind sämtliche für die Strukturaufklärung der verschiedenen Glycolipide aufgenommenen NMR- und MS-spektrometrischen Daten zusammengefasst. Die Nummerierung der Zucker erfolgt wie in Abbildung 3.1-3.3 dargestellt.

Tabelle 6.1: ^1H -NMR-Daten der Zuckergrundgerüste des Glycolipids GL 1 (Kultivierung mit Sonnenblumenöl) in CD_3OD , d Dublett, t Triplett, q Quartett, m Multiplett, n.b. nicht bestimmbar.

Zucker	Glycolipid GL 1		
	Proton	δ [ppm]	J [Hz]
Zucker A	H-1	5.14 d	(1-2) 3.7
	H-2	5.35 dd	(2-3) 9.8
	H-3	3.81 dd	(3-4) 8.9
	H-4	3.37 dd	(4-5) 8.9
	H-4	3.70 m	
	H-6A	3.70-3.80 m	
	H-6B	3.70-3.80 m	
Zucker B	H-1	5.34 d	(1-2) 3.6
	H-2	4.91 dd	(2-3) 10.3
	H-3	5.53 dd	(3-4) 9.7
	H-4	3.66 dd	(4-5) 9.7
	H-5	4.04 ddd	(5-6A) 2.3
	H-6A	3.85 dd	(5-6B) 4.7
	H-6B	3.78 dd	(6A-6B) 12.0

Tabelle 6.2: ^1H -NMR-Daten der Zuckergrundgerüste des Glycolipids GL 1B (Kultivierung mit Sonnenblumenöl) in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ (30/70), d Dublett, t Triplett, q Quartett, m Multiplett, n.b. nicht bestimmbar.

Zucker	Glycolipid GL 1B		
	Proton	δ [ppm]	J [Hz]
Zucker A	H-1	5.10 d	(1-2) 3.7
	H-2	3.55 dd	(2-3) 9.8
	H-3	3.80 m	n.b.
	H-4	3.31 t	(4-5) 9.7
	H-4	3.80 m	
	H-6A	4.30-4.25 m	
	H-6B	4.30-4.25 m	
Zucker B	H-1	5.25 d	(1-2) 3.5
	H-2	4.80 dd	(2-3) 10.0
	H-3	5.45 dd	(3-4) 10.6
	H-4	3.62 dd	(4-5) 9.3
	H-5	3.94 ddd	(5-6A) 2.6
	H-6A	3.72 dd	(5-6B) 5.3
	H-6B	3.78 dd	(6A-6B) 9.8

Tabelle 6.3: ^1H -NMR-Daten der Zuckergrundgerüste des Glycolipids GL 2 (Kultivierung mit Sonnenblumenöl) in CD_3OD , d Dublett, t Triplett, q Quartett, m Multiplett, n.b. nicht bestimmbar.

Zucker	Glycolipid GL 2		
	Proton	δ [ppm]	J [Hz]
Zucker A	H-1	5.10 d	(1-2) 3.5
	H-2	3.59 dd	(2-3) 9.7
	H-3	3.86 dd	(3-4) 9.7
	H-4	4.98 dd	(4-5) 9.7
	H-5	4.37 ddd	(5-6A) 2.7
	H-6A	4.27 dd	(5-6B) 2.7
	H-6B	4.19 dd	(6A-6B) 12.2
Zucker B	H-1	5.26 d	(1-2) 3.5
	H-2	3.68 dd	(2-3) 9.9
	H-3	3.87 m	(3-4) 9.4
	H-4	3.38 t	(4-5) 9.4
	H-5	3.92 m	(5-6A) 1.9
	H-6A	3.82 dd	n.b.
	H-6B	3.72 m	(6A-6B) 11.4
Zucker C	H-1	4.88 d	(1-2) 8.4
	H-2	4.81 dd	(2-3) 9.3
	H-3	5.10 t	(3-4) 9.3
	H-4	3.52 t	(4-5) 9.3
	H-5	3.44 ddd	(5-6A) 1.8
	H-6A	3.94 dd	(5-6B) 5.9
	H-6B	3.74 m	(6A-6B) 11.8

Tabelle 6.4: ^1H -NMR-Daten der Zuckergrundgerüste des Glycolipids GL 3 (Kultivierung mit Sonnenblumenöl) in CD_3OD , d Dublett, t Triplett, q Quartett, m Multiplett, n.b. nicht bestimmbar.

Zucker	Glycolipid GL 3		
	Proton	δ [ppm]	J [Hz]
Zucker A	H-1	5.07	(1-2) 3.6
	H-2	3.59 dd	(2-3) 9.8
	H-3	3.80 dd	(3-4) 9.0
	H-4	4.97 t	(4-5) 9.0
	H-5	4.31 ddd	(5-6A) 2.8
	H-6A	4.30 dd	(5-6B) 2.8
	H-6B	4.17 dd	(6A-6B) 12.2
Zucker B	H-1	5.15 d	(1-2) 2.9
	H-2	3.61 m	
	H-3	3.81 m	
	H-4	3.35 m	
	H-5	4.07 m	
	H-6A	4.05 m	
	H-6B	3.80 m	
Zucker C	H-1	4.79 d	(1-2) 8.0
	H-2	4.75 dd	(2-3) 9.0
	H-3	5.07 t	(3-4) 9.0
	H-4	3.55 m	(4-5) n.b.
	H-5	3.38 m	(5-6A) 2.0
	H-6A	3.85 dd	(5-6B) n.b.
	H-6B	3.71 m	(6A-6B) 12.0
Zucker D	H-1	4.31 d	(1-2) 7.6
	H-2	3.53 m	
	H-3	3.48 m	
	H-4	3.86 m	
	H-5	3.48 m	
	H-6A	3.81 m	
	H-6B	3.72 m	

Tabelle 6.5: ^1H -NMR-Daten der Hauptacylsubstituenten der Glycolipide GL 1-3 (Kultivierung mit Sonnenblumenöl) in CD_3OD , d Dublett, t Triplett, q Quartett, m Multiplett (GL 1B in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ 30/70).

Glycolipid	Acyl-Rest	Proton	δ σ [ppm]	J [Hz]
GL 1	C4:0	H-2	2.36 m	(2-3) 7.3
		H-3	1.67 tq	(3-4) 7.3
		H-4	1.00 t	
	C18:1	H-2	2.37 m	
		H-3	1.62 m	
		H-18	0.94 t	(17-18) 7.2
		$\text{CH}_2\text{CH=}$	5.39 m	
		$\text{CH}_2\text{CH=}$	2.07 m	
		Rest	1.45-1.27 m	
GL 1B	C4:0	H-2	2.29 m	(2-3) 7.9
		H-3	1.65 m	(3-4) 7.5
		H-4	0.95 t	
	C18:1 2x	H-18	0.88 t	
		$\text{CH}_2\text{CH=}$	5.37 m	
		$\text{CH}_2\text{CH=}$	2.05 m	
		Rest	1.40-1.20 m	
			1.50-1.70 m	
			2.20-2.40 m	
GL 2	C6:0	H-2	2.55-2.26 m	
		H-3	1.77-1.59 m	
		H-4/H-5	1.45-1.32 m	
	C8:0	H-6	1.00-0.92 m	
		H-2	2.55-2.26 m	
		H-3	1.77-1.32 m	
		H-4 – H-7	1.45-1.32 m	
		H-8	1.00-0.92 m	
GL 3	C6:0		die Verschiebungen für C6 und C7 sind im selben Bereich wie bei GL 2	
	C8:0			
		$\text{CH}_2\text{CH=}$	5.39 m	
		$\text{CH}_2\text{CH=}$	2.07 m	

Tabelle 6.6: ^{13}C -NMR-Daten der Zucker-Einheiten der Glycolipide GL 1-3 (Kultivierung mit Sonnenblumenöl) in CD_3OD , (GL 1B in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ 30/70).

Glycolipid	Chemische Verschiebung [ppm]				
	C-Atom	Zucker A	Zucker B	Zucker C	Zucker D
GL 1	C-1	95.9	92.9		
	C-2	73.0	72.1		
	C-3	74.6	73.8		
	C-4	71.6	69.7		
	C-5	74.3	73.8		
	C-6	62.0	62.5		
GL 1B	C-1	94.3	91.7		
	C-2	71.8	70.9		
	C-3	72.7	72.4		
	C-4	70.8	69.2		
	C-5	73.6	72.4		
	C-6	63.7	61.6		
GL 2	C-1	96.3	96.0	103.0	
	C-2	73.2	79.6	73.1	
	C-3	72.7	74.1	76.8	
	C-4	72.0	72.3	70.1	
	C-5	69.7	73.9	78.1	
	C-6	63.5	62.5	62.5	
GL 3	C-1	96.6	96.3	103.0	105.3
	C-2	73.2	79.4	73.1	72.7
	C-3	72.6	74.0	76.7	75.0
	C-4	72.0	72.2	70.1	70.3
	C-5	68.8	73.2	78.1	76.7
	C-6	63.5	69.7	62.5	62.5

Tabelle 6.7: ^{13}C -NMR-Daten der Acylsubstituenten der Glycolipide GL 1-3.

Glycolipid	Acyl-Rest	C-Atom			chemische Verschiebung [ppm]
GL 1	C4:0	C-1			174.6
		C-2			37.1
		C-3			19.4
		C-4			14.0
	C18:0	C-1			174.4
		C-2			34.9
		C-3			25.9
		C-16			33.0
		C-17			23.7
		C-18			14.4
		CH ₂ CH=			28.1
		CH ₂ CH=			130.9, 130.8
		Rest			30.8-28.1
GL 1B	C4:0	C-1			174.2
		C-2			184.4
		C-3			36.47
		C-4			14.0
	C18:1	C-1	C18:1	C-1	174.6, 173.3
					C-3
		CH ₂ CH=	CH ₂ CH=	130.3, 130.0, 130.9	
		CH ₂ CH=	CH ₂ CH=	30.0, 29.9, 29.8, 29.5, 29.4	
					34.3, 34.2, 32.2, 31.0
		Rest			25.1, 24.9, 23.0
					18.7, 14.2, 14.0, 13.7
	GL 2	C6:0	C8:0	C-1	175.3, 174.7, 174.6, 173.7
				C-2	35.2, 35.1, 35.0, 35.0
C-3				26.0, 25.9, 25.7, 25.7	
C-4				32.9, 32.9, 32.6, 32.5	
C-5				23.7, 23.7, 23.4, 23.4	
C-6				14.4, 14.4, 14.4, 14.3	
C-4/5				30.3, 30.2, 30.2, 30.2	
GL 3	C6:0	C8:0	C-1	175.3, 174.7, 174.6, 173.7	
			C-2	35.2, 35.1, 35.0, 35.0	
			C-3	26.0, 25.9, 25.7, 25.7	
			C-4	32.9, 32.9, 32.6, 32.4	
			C-5	23.7, 23.7, 23.4, 23.4	
			C-6	14.4, 14.4, 14.4, 14,3	
			C-4/5	30.3, 30.2, 30.2, 30.1	

Tabelle 6.8: Massenspektrometrische Analyse der Glycolipidgemische GL 1-3 (Kultivierung mit Sonnenblumenöl). Positive und negative ESI-Massenspektren; n.b. nicht bestimmt.

Glycolipid	Molekular- masse	Masse der Molekülionen		Acyl-Reste identifiziert über MS- MS	Prozent- ualer Anteil [%]
		[M+Na] ⁺	[M – H] ⁻		
GL 1	648	671	647	C4:0/C18:1	10
				C2:0/C18:1	5
	676	699	675	C4:0/C18:1	58
	704	727	703	C6:0/C16:1	27
GL 1B	940	963	939	C4:0 C18:1/C18:1	57
	968	991	967	C6:0 C18:1/C18:1	26
				C3:0 C18:1/C18:1	5
				C4:0 C16:1/C18:1	12
GL 2	952	975	951	C6:0, C8:0/C6:0, C8:0	100
GL3	1086	1109.6	1085.7	C6:0, C6:0/C6:0, C8:0	8
	1112	1135.6	1111.7	C6, C78/C6, C8 mit1 C=C in C6 oder C8	11.
	1100	1123.4	1099.7	C6:0, C8:0/C6:0, C7:0	10
	1114	1137.6	1113.6	C6:0, C8:0/C6:0, C8:0	70

Tabelle 6.9: Massenspektrometrische Analyse der Glycolipidgemische GL 1-3 aus der Kultivierung mit Calendulalöl.

Glycolipid	Molekularmasse	Masse der Molekülionen	Prozentualer Anteil [%]
		[M+Na] ⁺	
GL 1	646	669.3	5
	674	997.4	57
	702	725.4	37
GL 2	952	975	100
GL3	1086	1109.5	8
	1112	1135.5	21
	1100	1124.4	0
	1114	1137.5	71

Tabelle 6.10: ^1H -NMR-Daten der Zuckergrundgerüste des Glycolipids GL 3-Ölsäure1 in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ (30/70) d Dublett, t Triplett, q Quartett, m Multiplett, n.b. nicht bestimmbar.

Zucker	Glycolipid GL 3-Ölsäure1		
	Proton	δ [ppm]	J [Hz]
Zucker A	H-1	5.07	(1-2) 3.6
	H-2	3.59 dd	(2-3) 9.8
	H-3	3.80 dd	(3-4) 9.0
	H-4	4.97 t	(4-5) 9.0
	H-5	4.31 ddd	(5-6A) 2.8
	H-6A	4.30 dd	(5-6B) 2.8
	H-6B	4.17 dd	(6A-6B) 12.2
Zucker B	H-1	5.15 d	(1-2) 2.9
	H-2	3.61 m	
	H-3	3.81 m	
	H-4	3.35 m	
	H-5	4.08 m	
	H-6A	4.11 m	
	H-6B	3.75 m	
Zucker C	H-1	4.79 d	(1-2) 8.0
	H-2	4.75 dd	(2-3) 9.0
	H-3	5.07 t	(3-4) 9.0
	H-4	3.55 m	(4-5) n.b.
	H-5	3.38 m	(5-6A) 2.0
	H-6A	3.85 dd	(5-6B) n.b.
	H-6B	3.71 m	(6A-6B) 12.0
Zucker D	H-1	4.32 d	(1-2) 7.6
	H-2	3.54 m	
	H-3	3.49 m	
	H-4	3.86 m	
	H-5	3.67 m	
	H-6A	4.28 - 4.18 m	
	H-6B	4.28 - 4.18 m	

Tabelle 6.11: ^1H -NMR-Daten der Zuckergrundgerüste des Glycolipids **G 3-Ölsäure1** in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ (30/70) d Dublett, t Triplett, q Quartett, m Multiplett, n.b. nicht bestimmbar.

Zucker	Glycolipid G 3-Ölsäure1		
	Proton	δ [ppm]	J [Hz]
Zucker A	H-1	5.07	(1-2) 3.6
	H-2	3.59 dd	(2-3) 9.8
	H-3	3.80 dd	(3-4) 9.0
	H-4	4.97 t	(4-5) 9.0
	H-5	4.31 ddd	(5-6A) 2.8
	H-6A	4.30 dd	(5-6B) 2.8
	H-6B	4.17 dd	(6A-6B) 12.2
Zucker B	H-1	5.15 d	(1-2) 2.9
	H-2	3.61 m	
	H-3	3.81 m	
	H-4	3.35 m	
	H-5	4.08 m	
	H-6A	4.11 m	
	H-6B	3.75 m	
Zucker C	H-1	4.79 d	(1-2) 8.0
	H-2	4.75 dd	(2-3) 9.0
	H-3	5.07 t	(3-4) 9.0
	H-4	3.55 m	(4-5) n.b.
	H-5	3.38 m	(5-6A) 2.0
	H-6A	3.85 dd	(5-6B) n.b.
	H-6B	3.71 m	(6A-6B) 12.0
Zucker D	H-1	4.32 d	(1-2) 7.6
	H-2	3.54 m	
	H-3	3.49 m	
	H-4	3.86 m	
	H-5	3.48 m	
	H-6A	3.80 m	
	H-6B	3.72 m	

Tabelle 6.12: ^1H -NMR-Daten der Acylsubstituenten der Glycolipide GL 3-Ölsäure1,2 und G 3-Ölsäure1 in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ 30/70, d Dublett, t Triplett, q Quartett, m Multiplett.

Glycolipid	Acyl-Rest	Proton	δ σ [ppm]	J [Hz]
GL 3 Ölsäure1	C18:1	H-2	2.37 m	
		H-3	1.62 m	
		H-18	0.94 t	(17-18) 7.2
		$\text{CH}_2\text{CH=}$	5.39 m	
		$\text{CH}_2\text{CH=}$	2.07 m	
		Rest	1.45-1.27 m	
GL 3 Ölsäure2	C18:1	H-2	2.37 m	
		H-3	1.62 m	
		H-18	0.94 t	(17-18) 7.2
		$\text{CH}_2\text{CH=}$	5.39 m	
		$\text{CH}_2\text{CH=}$	2.07 m	
		Rest	1.45-1.27 m	
	ungebundene Ölsäure		0.15-0.10 m	
G 3-Ölsäure1	C18:1	H-2	2.37 m	
		H-3	1.62 m	
		H-18	0.94 t	(17-18) 7.2
		$\text{CH}_2\text{CH=}$	5.39 m	
		$\text{CH}_2\text{CH=}$	2.07 m	
		Rest	1.45-1.27 m	

6.2 Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Abb.		Abbildung
ATCC		American Type Culture Collection
a_w		Wasseraktivität
BTM	[g]	Biotrockenmasse
cmc		kritische Micellbildungskonzentration
δ	[ppm]	chemische Verschiebung
d		Dublett
DC		Dünnschichtchromatographie
$\Delta[S]$	[g l ⁻¹]	Substratverbrauch
dest.		destilliert
EDTA		Ethylendiamintetraessigsäure
EI		Elektronenstoß Ionisation
ESI		Elektrospray Ionisation
FAB-MS		Fast-Atom-Bombardement-Massenspektroskopie
HPLC		High Performance Liquid Chromatography
Hz		Hertz
GL		Glycolipid
m		Multiplett
min		Minuten
<i>MG</i>	[g mol ⁻¹]	Molekulargewicht
MPLC		Mitteldruckchromatographie
MS		Massenspektrometrie
MTBE		tert-Butylmethylether, Methyl-tert-butylether
μ	[h ⁻¹]	spezifische Wachstumsrate
NMR		Kernresonanzspektroskopie
NP		normal phase Kieselgel
p^N	[bar]	Gasdruck unter Normbedingungen
pO_2		Sauerstoffpartialdruck
ppm		parts per million
P_V	[kg m ⁻³ h ⁻¹]	volumetrische Produktivität
q		Quartett

Q_{CO_2}	$[g\ l^{-1}\ h^{-1}]$	Kohlendioxidbildungsrate
Q_{O_2}	$[g\ l^{-1}\ h^{-1}]$	Sauerstoffaufnahme
R	$[J\ mol^{-1}\ K^{-1}]$	allgemeine Gaskonstante
RP		reversed phase Kieselgel
RQ	[1]	Respirationsquotient
SLMP		Standardliter pro Minute
tBME		tert-Butylmethylether, Methyl-tert-butylether
T^N	$[^{\circ}C]$	Temperatur unter Normbedingungen
\dot{V}^N	$[l\ h^{-1}]$	Volumenstrom der Zuluft unter Normbedingungen
V_R	[l]	Reaktorvolumen
x_i^A	[1]	Molenbruch der Komponente i am Gasaustritt
x_i^E	[1]	Molenbruch der Komponente i am Gaseintritt
R_t	[min]	Retentionszeit
RT	$[^{\circ}C]$	Raumtemperatur
Upm		Umdrehungen pro Minute
UV		Licht im ultravioletten Bereich
UV-Vis		Licht vom ultravioletten bis zum sichtbaren Bereich
v/vm		Volumen pro Volumen und Minute
Vol%		Volumenprozent
$Y_{P/S}$		spezifischer Ausbeutekoeffizient in g Glycolipid pro g Substrat
$Y_{P/X}$		spezifischer Ausbeutekoeffizient in g Glycolipid pro g Biomasse
$Y_{X/S}$		spezifischer Ausbeutekoeffizient in g Biomasse pro g Substrat

7 LITERATUR

- ADAM, W. und HEUSCH, R., 1993. Tenside in Industrie und Technik. In: Die Tenside. Koswig, K. und Stache, H. (eds), 1993. Carl Hanser Verlag, München, Wien, 357-408.
- ALBRECHT, A., 1997. Biosynthese von Sophoroselipiden mit *Candida bombicola* ATCC 22214. Dissertation Technische Universität Braunschweig.
- AKIRA, S. und AKIRA, Y., 1997. Modification of Wheat Flour Products. Japanese Patent (Kao Corporation, Jpn. Kokai Tokyo, 6pp.) (JP 61205 A2 860911 Showa, JP 85-45850 850308).
- ASMER, H.J., LANG, S., WAGNER, F., WRAY, V., 1988. Microbial Production, Structure Elucidation and Bioconversion of Sophorose Lipids. JAOCS **65**, 1460 - 1466
- ASMER, H.J., 1991. Trehaloselipid-Bildung: Untersuchungen zur Substratspezifität und biochemischen Acylierung von Trehalose durch das marine Bakterium *Arthrobacter spec.* EK1. Dissertation TU Braunschweig.
- AULMANN, W. und STERZEL, W., 1996. Toxicology of Alkyl Polyglycosides. In: Alkyl Polyglycosides, Hrsg. Hill, K., von Rybinsky, W. and Stoll, G.. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, pp. 151-167.
- ASSELINEAU, C., ASSELINEAU, J., 1978. Trehalose-containing glycolipids. In: Progress in the chemistry of fats and other lipids, Vol **16**, pp 55-99, Pergamon Press.
- AZUMAL, M., SAZAKI, K., NISHIKAWA, Y., TAHASHI, T., SHINMODA, A., SUZUTANI, T., YOSHIDA, I., SAKUMA, T. and NAHAYA, K., 1988. Correlation between Argumented Resistance to Influenza Virus Infection and Histological Changes in Lung of Mice Treated with Trehalose-6,6'-dimycolate. J Biol Response Mod **7**, 473-482.
- BATRAKOV, S.G., ROZYNOV, B.V., KORONELLI, T.V. und BERGELSON, L.D., 1981. Two novel types of trehalose lipids. Chem Phys Lipids **29**, 241-266.
- BEAR, H.H. and WU, X., Synthesis of α,α -Trehalose 2,3- and 2,3'-diesters with Palmitic and Stearic Acid: potential Immunoreactants for the Serodiagnosis of Tuberculosis. Carbohydr Res **228**, 215-230
- BEKIERKUNST, A., LEVIJ, I.S. and YARKONI, E., 1971. Suppression of Urethane-Induced Lung Adenomas in Mice Treated with Trehalose-6,6-dimycolate (Cord Factor) and Living *Bacillus calmette guérin*. Science **174**, 1240-1242.
- BERSA, G. S., BOLTON, R. C., MCNEIL, M. R., RIDELL, M., SIMPSON, K. E., GLUSHKA, J., VAN HALBEEK, H., BRENNAN, P. J. and MINNIKIN, D E., 1992. Structural Elucidation of an Noval Family of Acyltrehalose from *Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry **31**, 9832-9837.

- BESRA, G.S., KHOO, K.-H., BELISLE, J.T., MCNEIL, M.R., MORRIS, H.R., DELL, A. and BRENNAN, P.J., 1994. New pyruvylated, glycosylated acyltrehaloses from *Mycobacterium smegmatis* strains, and their implications for phage resistance in mycobacteria. *Carbohydr Res* **251**, 99-114.
- BEVINAKATTI, H.S. und MISHRA, B.K., 1999. Sugar derived surfactants. In: Design and selection of performance surfactants (Karsa, D.R.; ed), in: Annual Surfactants Review (Karsa, D.R., Bognolo, G., Callaghan, I.C., Harwell, J.H., Tsushima, R.; eds). Vol. **2**, pp 1-50, Sheffield, UK: Sheffield Academic Press.
- BOOTHROYD, B., THORN, J. A. and HASKINS, R. H., 1956. Biochemistry of the Ustilaginales XII. Characterization of Extracellular Glycolipids Produced by *Ustilago* sp.. *Can J Biochem Physiol* **34**, 10-14.
- BORNSCHEUER, U. T., KAZLAUSKAS, R. J., 1999. Hydrolases in Organic Synthesis – Regio and Stereoselective Biotransformation. (Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany).
- BORNSCHEUER, U. T. ed., 2000. Enzymes in Lipid Modification (Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany).
- BRADY, L. et al., 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**, 767-770.
- BRAKEMEIER, A., 1997. Mikrobielle Alkyl-Glycoside von *Candida bombicola*: Gewinnung, Strukturaufklärung und physiko-chemische Charakterisierung. Dissertation TU Braunschweig.
- BRENNAN, P.J., 1988. *Mycobacterium* and other actinomycetes. In: Ratledge, C. and Wilkinson, S.G.(eds) *Microbial Lipids*, Vol **1**, pp. 293-298. Academic Press, London, San Diego, New York, Berkeley, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.
- BREZESINSKI, G. und MÖGEL, H.J., 1993. Grenzflächen und Kolloide (Spektrum Akademischer Verlag, Berlin)
- BROCKERHOFF, H., JENSEN, R.G., 1974. Lipolytic enzymes. Academic Press, New York.
- BROWN, W.A. and COOPER, D.G., 1991. Self-cycling fermentation applied to *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2901-2906.
- BUCHTMANN, C., 1996. Untersuchungen zur Leistungssteigerung eines biochemischen Reaktors für den Abbau heteroaromatischer Verbindungen. Dissertation GBF/TU-Braunschweig. Fortschrittbericht VDI, Reihe 3: Verfahrenstechnik, Nr. **433**.
- CARRERA, G., RIVA, G., 2000. Enzyme in organischen Lösemitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese. *Angew Chem* **112**, 2312-2341.
- CHUN, J., KANG, S.-O., HAH, Y.C. and GOODFELLOW, M., 1996. Phylogeny of mycolic acid-containing actinomycetes. *J Ind Microbiol* **14**, 205-213.

- COLLINS, M. D., SMIDA, J., DORSCH, M. and STACKEBRANDT, E., 1988. *Tsukamurella* Gen. Nov. Harboring *Corynebacterium paurometabolum* and *Rhodococcus aurantiacus*. Int J Syst Bacteriol **38**, 385-391
- COLOMBO, D., SCALA, A., TAINO, I., TOMA, L., RONCHETTI, F., TOKUDA, H., NISHINO, H., NAGATSU, A., SAKAKIBARA, J., 1996: 1-O-, 2-O- and 3-O- β -Glycosyl-sn-Glycerol: Structure-Anti-Tumor-Promoting Activity Relationship, Bioorg. Med. Chem. Lett. **6**, 1187-1190
- COLOMBO, D., COMPOSTELLA, F., RONCHETTI, F., SCALA, A., TOMA, L., MUKAINAKA, T., NAGATSU, A., KONOSHIMA, T., TOKUDA, H., NISHINO, H., 1996: Inhibitory Effects of Monoacylated 2-O- β -galactosylglycerol on Epstein-Barr Virus Activation: The Significant Role of the Hexanoyl Chain, Cancer Letters **143**, 1-4
- COLOMBO, D., SCALA, A., TAINO, I., TOMA, L., RONCHETTI, F., TOKUDA, H., NISHINO, H., NAGATSU, A., SAKAKIBARA, J., 1998: Inhibitory Effects of Fatty Acid Monoesters of 2-O- β -D-Glucosylglycerol on Epstein-Barr Virus Activation, Cancer Letters **123**, 83-86
- COLOMBO, D., RONCHETTI, F., SCALA, A., TOMA, L., 1998a) Bioactive Glycoglycerolipid Analogues: An Expedient Enzymatic Approach to Mono- and Diesters of 2-O- β -Digalactosylglycerol, Tetrahedron Asymmetry. **9**, 2113-2119
- COMMEN, R., ARTURO, M., JOSEFA, B. AND JOSE, L.I., 1985. A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. Analytical Biochemistry **149**, 556-571.
- COULON, D. und GHOU, M., 1998. The enzymatic synthesis of non-ionic surfactants: the sugar esters – An overview. Agro-Food-Industry Hi-Tech **9**, 22-26.
- CZESCHKA, K., 1995. Einfluß von Starterkulturen und Tensiden auf den Abbau von Kohlenwasserstodden in Bodenfestbettreaktoren. Dissertation Technische Universität Braunschweig.
- D'ANS-LAX, 1967. Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Ed. Lax E, Band I, Makroskopische und physikalische Eigenschaften. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- DAVILA, A. M., MARCHAL, R. and VANDECASTEELE, J.-P., 1992. Kinetics and Balance of a Fermentation free from Product Inhibition: Sophorose Lipid Production by *Candida bombicola*. Appl Microbiol Biotechnol **38**, 6-11.
- DAVILA, A. M., MARCHAL, R., MONIN, N. and VANDECASTEELE, J.-P., 1993. Identification and Determination of Individual Sophorolipids in Fermentation Products by Gradient Elution High Performance Liquid Chromatography Evaporative Light-Scattering Detection. J Chromatography **648**, 139-149.
- DE KOSTER, C.G., HEERMA, E., PEPEMANS, H.A.M., GROENEWEGEN, A., PETERS H. and HAVERKAMP, H., 1995. Tandem Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Studies of *Candida bombicola* Sophorolipids and Product Formed on Hydrolysis by Cutinase. Anal Biochem **230**, 135-148.

- DEGN, P., ZIMMERMANN, W., 2001. Optimazation of Carbohydrate Fatty Acid Ester Synthesis in Organic Media by a Lipase from *Candida antarctica*. Biotechnol Bioeng **74**, 483-491.
- DESAI, J. D. and BANAT, I. M., 1997. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. Microbiol Molecular Biol Rev **61**, 47-64.
- DISCHE, Z., 1955. Color reactions of nucleic acid components. In Chargaff., E. and Davidson, JN.: The nucleic acids. New York: Academic Press, **1**, pp. 286-290.
- EINSELLE, A., Finn, R. K., Samhaber, W., 1985. Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik: Eine Einführung. (VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim)
- EL-SHARKAXY, S. H., 1996. Production of Useful Chemicals from Sunflower Oil by Microbial Biotransformation with *Rhizopus stolonifer* NRRL 1478. Australian Biotechnol **6**(1), 8-12.
- ESDERS, T.W. and LIGHT, R.J., 1971. Glucosyl- and Acetyltransferases Involved in the Biosynthesis of Glycolipids from *Candida bogoriensis*. J Biol Chem **27**, 1375-1386.
- ESKUCHEN, R. und NITSCHKE, M., 1996. Technology and Production of Alkyl Polyglycosides. In Alkyl Polyglycosides, eds. Hull, K., von Rybinski, W. und Stoll, G., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, pp. 9-22.
- ESPUNY, M. J., EGIDO, S., MANRESA, R.A. and MERCADE, M.E., 1996. Nutritional Requirements of a Biosurfactant Producing Strain *Rhodococcus* sp 51T7. Biotechnol Letters **18**, 521-526.
- FABRY, B., 1991. Tenside. Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendung. Chemie in unserer Zeit **4**, 214-22.
- FAWCETT, J. K. and SCOTT, J. E., 1960. A Rapid and Precise Method for the Determination of Urea. Journal of Clinical Pathways **13**, 156
- FERRER, M., CRUCES, M. A., BERNABÉ, M., BALLESTEROS, A., PLOU, F. J., 1999. Lipase catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. Biotechnol Bioeng **65**, 10-16.
- FERRIER, R. J., 1961. The interaction of phenylboronic acid with hexosides. J. Chem. Soc. 2325-2336.
- FERRIER, R. J., PRASAD, D., RUDOWSKI, A. AND SANGSTER, I., 1964. Boric acid derivatives reagents in carbohydrate chemistry. Part II. The interaction of phenyl boronic acid with methyl xylopyranosides. J. Chem. Soc. 3330-3334.
- FERRIER, R. J., PRASAD, D. AND RUDIKOWSKI, A., 1965. Boric acid derivatives as reagents in carbohydrate chemistry. Part III. The interaction of phenyl boronic acid with methyl xylofuranosides and the isolation of four methyl xylosides. J. Chem. Soc. 858-863.

- FERRIER, R. J., HANNAFORD, A. J., OVEREND, W. G. AND SMITH, B. C., 1965. Boric acid derivatives as reagents in carbohydrate chemistry. Part IV. The interaction of phenylboronic acid with hexopyranoid compounds. *Carbohydr Res.* **1**, 38-43.
- FERRIER, R. J. AND PRASAD, D., 1965. Boric acid derivatives as reagents in carbohydrate chemistry. Part V. The interaction of phenyl boronic acid with methyl pentapyranosides: synthesis of 3- and 2,4-substituted ribose derivatives. *J. Chem Soc.* 7425-7428.
- FERRIER, R. J. AND PRASAD, D., 1965. Boric acid derivatives as reagents in carbohydrate chemistry. Part VI. Phenylboronic acid as a protecting group in disaccharide synthesis. *J. Chem. Soc.* 7429-7432.
- FIEHLER, K., ALBRECHT, A., RASCH, D. und RAU, U., 1997. Kontinuierliche Produktion von Sophoroselipiden mit *Candida bombicola* ATCC 22214. *Fett/Lipid* **99**, 19-24.
- FINNERTY, W.R., 1994. Biosurfactants in environmental biotechnology. *Curr Opinion Biotechnol* **5**, 291-295.
- FRAUTZ, B., 1986. Bildung und Charakterisierung von Glycolipiden bei *Ustilago maydis* ATCC 14826 in Abhängigkeit vom Substrat. Dissertation Technische Universität Braunschweig.
- GEKE, J., JAKOBI, G., KIHN-BOTULINSKI, M., SPECKMANN, H.-D., 1993. Tenside zum Reinigen von Textilien und harten Oberflächen im Haushalt und im industriellen Bereich. In: Kosswig, K. und Stache, H. (eds), *Die Tenside*, pp. 381-337, Carl Hanser Verlag, München, Wien.
- GEORGIU, G., LIN, S.-C. and SHARMA, M.M., 1992. Surface-Active Compounds from Microorganisms. *Bio/Technol* **10**, 60-65.
- GIANIS, A., 1994. Die Sialyl-Lewis-X-Gruppe und ihre Analoga als Liganden für Selektine: chemoenzymatische Synthesen und biologische Funktionen. *Angew Chem* **106**, 188-191.
- GOODFELLOW, M., ZAKRZWSKA-CZERWINSKA, J., THOMAS, E. G., MORDARSKI, M., WARD A. C. and JAMES, A. L., 1991. Polyphasic Taxonomic Study of the Genera *Gordona* and *Tsukamurella* Including the Description of *Tsukamurella wratislaviensis* SP. Nov.. *Zbl Bakt* **275**, 162-178
- GOODFELLOW, M., 1992. The Family *Norcardiaceae*. In: *The Prokaryotes*, Second Edition, Vol III. A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification, Application, Eds. Balous, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Tno, W. H. and Schleifer, K.-H., Springer Verlag, Berlin, Chapter **51**, pp 1188-1207
- GORBACH, V.I., KRASIKOVA, I.N., LUK YANOV, P.A., LOENKO, Y.N., SOLOV'eva, T.F., OVODOV, Y.S., DEEV, V.V. and PIMENOV, A.A., 1994. New Glycolipids (Chitooligosaccharide Derivates) Possessing Immunostimulating and Antitumor Activities. *Carbohydr Res* **260**, 73-82.
- GOREN, M.B., 1972. Mycobacterial lipid: selected topics. *Bacteriol Rev* **36**, 33-64

- GRAND-PERRET, T., LEPOIRE, M., PETIT, J-F. AND LEMAIRE, G., 1986. Macrophage Activation by Trehalose Dimycolate Requirement for an Expression Signal in Vitro for Antitumoral Activity; biochemical Markers Distinguishing Primed and Fully Activates Macrophages. Eur J Immunol **16**, 332-338.
- GROCHULSKI, P., LI, Y., SCHRAG, J.D., BOUTHILLIER, F., SMITH, P., HARRISON, D., RUBIN, B., CYGLER, M., 1993. Insight into interfacial activation from an open "structure" of *Candida rugosa* lipase. J Biol Chem **268**, 12843-12847.
- GUERRA-SANTOS, L., KÄPPELI, O. and FIECHTER, A., 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Appl Environ Microbiol **48**, 301-305.
- GUERRA-SANTOS, L.H., KÄPPELI, O. and FIECHTER, A., 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl Microbiol Biotechnol **24**, 443-448.
- GURA, E., 1992. Prozessentwicklung zur Bildung eines verzweigten β -1,3-Glucans. Dissertation, TU-Braunschweig
- GUTNIK, D., 1994. Microbiological treatment of contaminated storage containers. Res Microbiol **145**, 55-60.
- HAAS, M.J., CICHOWICZ, D.J., PHILLIPS, J., MOREAU, R., 1993. The Hydrolysis of Phosphatidylcholine by an Immobilized Lipase: Optimaziation of Hydrolysis in Organic Solvents, J Am Oil Chem Soc **70**, 111-117
- HAFERBURG, D., HOMMEL, R., CLAUS, R. und KLEBER, H.-P., 1986. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. Adv Biochem Eng/Biotechnol **33**, 53-93.
- HAFERBURG, D., HOMMEL, R., KLEBER, H.-P., KLUGE, S., SCHUSTER, G und ZSCHIEGNER, H.-J., 1987. Antiphytovirale Aktivität von Rhamnolipid aus *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Biotechnol **7**, 353-356.
- HARKINS, W.D. und JORDAN, H.F., 1930. A Method fort he Determination of Surface and Interfacial Tension from the Maximum Pull on a Ring. Journal of the American Chemical Society **52**, 1751-1771
- HARTMANN, S., BESRA, G.S., FRASER, J.L., KÖNIG, W.A, MINNIKIN, D.E. and RIDELL, M., 1994. Stereochemistry of 2,4-dimethyleicos-2-enoate from pyruvylated glycolipid of *Mycobacterium smegmatis*. Biochim Biophys Acta **1201**, 339-344.
- HAUTHAL, H. G., 1996. Nachwachsende Rohstoffe – Perspektiven für die Chemie. Nachr Chem Tech Lab **44**, 32-35.
- HAUTHAL, H. G., 1996. Olympiade der Tenside. Nachr Chem Tech Lab **44**, 876-878.
- HECKMANN, R., 1995. Screening nach Glycolipid produzierenden Mikroorganismen. Interner Arbeitsbericht, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abt. Biotechnologie, TU-Braunschweig.

- HECKMANN, R., 1992. Einsatz verschiedener Träger zur Immobilisierung einer selektionierten Mischkultur und Reinigung lösungsmittelhaltiger Abluft mit Hilfe eines Rieselbettreaktors. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- HERZFELD, S.H., 1952. Critical Concentrations of Potassium n-Alkane-Carboxylates as Determined by the Change in Color and Spectrum of Pinacyanole. *J Phys Chem* **56**, 953.
- HEUSCH, R., 1993. Grundlagen zur Emulgierwirkung von Tensiden. In: Die Tenside. Eds. Kosswig, K. und Stache, H., 1993. Carl Hanser Verlag, München, Wien, pp. 203-249
- HEUSCH, R., 1975. Tensidstrukturen und ihre technische Anwendung. *Tensid Detergents* **12**, 81-93
- HILL, K., 1998. Fats and Oils as Oleochemical Raw Materials. Recent Developments and Perspectives. *Agro-Food-Industrie Hi-Tech* 9-15.
- HISATSUKA, K., NAKAHARA, T., MINODA, Y. and YAMADA, K., 1975. Capacity to Oxidize n-Alkane in EDTA-Treated Cells of *Pseudomonas aeruginosa* S₇B₁. *Agric Biol Chem* **39**, 999-1005.
- HISATSUKA, K., NAKAHARA, T., MINODA, Y. and YAMADA, K., 1977. Formation of Protein-like Activator for n-Alkane Oxidation and its Properties. *Agric Biol Chem* **41**, 445-450.
- HOFFMAN, H. und ULBRICHT, W., 1993. Physikalische Chemie der Tenside. In: Kosswig, K. und Stache, H. (eds). Die Tenside, pp. 1-114. Hanser, München, Wien.
- HOLST, O., ULMER, A. J., BRADE, H., FLAD, H.-D. and RIETSCHEL, E. T., 1996. Biochemistry and Cell Biology of Bacterial Endotoxins. *FEMS Immun Med Microbiol* **16**, 83-104.
- HOMMEL, R. and RATLEDGE, C., 1993. Biosynthetic Mechanisms of Low Molecular Weight Surfactants and Their precursor Molecules. In: Biosurfactants, Production, Properties, Applications. Ed.: Kosaric, N., Dekker, M., Inc., New York, Basel, Hong Kong, pp. 4-63.
- HUNTER, S.W., MURPHY, R.C., CLAY, K., GOREN, M.B. and BRENNAN, P.J., 1983. Trehalose-containing lipooligosaccharides. A new class of species-specific antigens from *Mycobacterium*. *J Biol Chem* **258**, 10481-10487.
- ICHIKAWA, Y., LIN, Y.-C., DUMAS, D.P., SHEN, G.-J., GARCIA-JUNCEDA, E., WILLIAMS, M.A., BAYER, R., KETCHAM, C., WALKER, L.E., PAULSON, J.C. and WONG, C., 1992. Chemical-Enzymatic Synthesis and Conformational Analysis of Sialyl Lewis X and Derivates. *J Am Chem Soc* **114**, 9283-9298.
- INOUE, S., 1988. Biosurfactants in cosmetic applications. In: Applewhite TH (ed) Proceedings of the World Conference on Biotechnology for the Fats and Oil Industry, pp. 206-210, American Oil Chemists' Society, USA.

- ISMAIL, A., SOULTANI, S. and GHOUL, M., 1999. Enzymatic-catalyzed synthesis of alkylglycosides in monophasic and biphasic systems. *J Biotechnol* **69**, 139-149.
- ISODA, H., KITAMOTO, D., SHINMOTO, H., MATASUMURA, M. and NAKAHARA, T., 1997. Microbial Extracellular Glycolipid Induction of Differentiation and Inhibition of the Protein Kinase C Activity of Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL60. *Biosci Biotech Biochem* **61**, 609-614.
- ISODA, H., SHINMOTO, H., MATASUMURA, M. and NAKAHARA, T., 1996. Succinoyl Trehalose Lipid Induced Differentiation of Human Monocytoid Leukemic Cell Line U937 into Monocyte-Macrophages. *Cytotechnol* **19**, 79-88.
- ISODA, H., KITAMOTO, D., SHINMOTO, H., MATASUMURA, M. and NAKAHARA, T., 1997. Differentiation of Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL60 by Microbial Extracellular Glycolipids. *Lipids* **32**, 263-271.
- ISODA, H., SHINMOTO, H., MATASUMURA, M. and NAKAHARA, T., 1995. Differentiation of Human Leukemia Cells by bacterial Extracellular Glycolipids. In: *Animal Cell Technology: Developments Towards the 21st Century*. Eds. Beuvery et al., Kluwer Academic Publishers, Niederlande, pp. 993-997.
- ITOH, D., HONDA, H., TOMITA, F., and SUZUKI, T., 1971. Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Grown on n-Paraffin (Mixture of C12,C13 and C14 fractions). *J Antibiotics* **24**, 855-859.
- ITOH, S. and INOUE, S., 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: Possible Relation to Alkane Uptake. *Appl Environ Microbiol* **43**, 1278-1283.
- KAMISANGO, K.-I., DAADAT, S., DELL, A. and BALLOU, C.E., 1985. Pyruvylated glycolipids from *Mycobacterium smegmatis*. Nature and location of the lipid components. *J Biol Chem* **260**, 4117-4121.
- KAWASHIMA, H., NAKAHARA, T., OOGAKI, M. and TYBUCHI, T., 1993. Extracellular Production of a Mannosylerythritol Lipid by a Mutant of *Candida spec.* from n-Alkanes and Triacylglycerols. *J Ferment Technol* **61**, 143-149.
- KESTING, W., TUMMUSCHEIT, M., SCHACHT, H. und SCHOLLMAYER, E., 1996. Ecological washing of textiles with microbial surfactants. *Prog Colloid Polym Sci* **101**, 125-130.
- KHIRE, J.M und KHAN, M.I., 1994. Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 1. Importance and mechanism of MEOR. *Enzyme Microb technol* **16**, 170-172.
- KIM, J.-S., POWALLA, M., LANG, S., WAGNER, F., LÜNSDORF, H. and WRAY, V., 1990. Microbial Glycolipid Production under Nitrogen Limitation and Resting Cell Conditions. *J. Biotechnol* **13**, 257-266.
- KIM, Y. S., 1997. Effect of Soybean Oil and Glucose on Sophorose Lipid Fermentation by *Candida bombicola* in Continuous Culture. *Appl Microbiol Biotech* **48**, 23-26.

- KITAMOTO, D., AKIBA, S., HIOKI, C., TABUCHI, T., 1990. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antartica*. *Agr Biol Chem* **54**, 31-36.
- KITAMOTO, D., HANEISHI, K., NAKAHARA, T., TABUCHI, T., 1990. Production of mannosylerythritol lipids by *Candida antartica* from vegetable oils. *Agr Biol Chem* **54**, 37-40.
- KITAMOTO, D., FUZUHIRO, T., YANAGISHITA, H., NATANE, T., NAKAHARA, T., 1992. Production of mannosylerythritol lipids as resting cells of *Candida antartica*. *Biotechnol Lett* **14**, 305-310.
- KITAMOTO, D., YANAGISHITA, H., SHINBO, T., NATANE, T., KAMISAWA, C. and NAKAHARA, T., 1993. Surface Active Properties and Antimicrobial Activities of Mannosylerythritol Lipids as Biosurfactants Produced by *Candida antartica*. *J Biotechnol* **29**, 91-96.
- KITAMOTO, D., YANAGISHITA, H., HARAYA, K. and KITAMOTO, H.K., 1998. Contribution of Chain-Shortening Pathway to the Biosynthesis of the Fatty Acids of Mannosylerythritol Lipid (Biosurfactant) in the Yeast *Candida Antartica*: Effect of β -Oxidation Inhibitors on Biosurfactant Synthesis. *Biotechnol Lett* **20**, 813-818.
- KLEIN, J. und WAGNER, F., 1987. Different strategies to optimize the production phase of immobilized cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **501**, 306-316.
- KLÜNER, T., HENNEKEN, L., GEHLE, M., BRÜGGENTHIES, A., NÖRTEMANN, B. und HEMPEL, D. C., 1984. Katabolismus von Ethylendiamintraacetat (EDTA). *BIOforum* **17**, 284-288.
- KOSARIC, N., 1996. Biosurfactants. In: Rehm, H.J., Reed, G., Pühler, A. und Stadler, P. (eds) *Biotechnology*, Vol **6**, pp. 659-717, VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo.
- KOSSWIG, K., 1982. Tenside. In: Ullmans Enzyklopädie der technischen Chemie. Eds. Bartholomé, E., Biekert, E., Weigert, W., Hellmann, H. und Weise, E., 4. Auflage, Band 22, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 455-515
- KOSSWIG, K., 1993. Herstellung, Eigenschaften und Verwendung von Tensiden. In: Kosswig, K. und Stache, H. (eds). *Die Tenside*, pp. 115-177. Hanser, München, Wien.
- KRETSCHMER, A., BOCK, H., WAGNER, F., 1982. Chemical and physical characterisation of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Appl Environ Microbiol* **44**, 864-870.
- KU, MA., HANG, YD., 1995. Ezymatic synthesis of esters in organic medium with lipase from *Byssoschlamys fluva*. *Biotechnol Lett* **17**, 1081-1084.
- LAANE, C., BOEREN, S., VOS, K., VEEGER, C., 1987. Medium engineering for bioorganic synthesis. *Biotechnol Bioeng* **30**, 81-87.

- LAFFERTY, R. M., 1981. Fermentation. II. Rotenburger Symposium. Springer-Verlag, Wien, New York.
- LANG, S., KATSIWELA, E. and WAGNER, F., 1989. Antimicrobial Effects of Biosurfactants. *Fat Sci Technol* **9**, 363-366.
- LANG, S. and WULBRANDT, D., 1998. Rhamnose Lipids – Biosynthesis, Microbial Production and Application Potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 22-32.
- LANG, S. and PHILP, J., 1998. Surface-active Lipids in Rhodococci. *Antonie van Leeuwenhoek* **74**, 59-70.
- LANG, S., TROWITZSCH-KIENAST, W., 2002. Biotenside. B. G. Teubner, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden
- LANG, S. and WAGNER, F., 1993. Bioconversion of Oils and Sugars to Glycolipids. In: *Biosurfactants, Production, Properties, Applications*. Ed. Kosaric, N., *Surfactant Science Series* **48**, pp. 205-255.
- LANG, S. and WAGNER, F., 1993b. Biological activities of biosurfactants. In: Kosaric, N. (ed) *Biosurfactants*. In: *Surfactant Series Vol 48*, pp. 251-268. Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong.
- LANG, S. and WAGNER, F., 1993c. Biosurfactants from marine microorganisms. In: Kosaric, N. (ed) *Biosurfactants*. In: *Surfactant Series Vol 48*, pp. 391-417. Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong.
- LANG, S. und WAGNER, F., 1995. Microbielle und enzymatische Synthese von Biotensiden auf der Basis nachwachsender Rohstoffe. *Fat Sci Technol* **2**, 69-77.
- LANG, S. und WULBRANDT, D., 1998. Rhamnose Lipids – Biosynthesis, Microbial Production and Application Potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 22-32.
- LECLERC, C., LAMENSANS, A., CHEDID, L., DRAPER, J.C., PETIT, J.F., WIETZERBIN, J. and LEDERER, E., 1976. Nonspecific Immunoprevention of L 1210 Leukemia by Cord Factor Administered in a Metabolizable Oil. *Cancer Immunol* **1**, 227-232.
- LEHMANN, J., 1978. Sauerstoff-fed-batch: Prozeßführung – Fermenter – Meßgeräte. GBF: Wissenschaftlicher Ergebnisbericht, 1978. GBF-Braunschweig.
- LEMIEUX, R. U., 1951. Biochemistry of the *Ustilaginales*: III. The Degradation Products and Proof of the Chemical Heterogeneity of the Ustilagic Acid. *Can J Chem* **29**, 415-425.
- LEMIEUX, R. U., 1953. Synthetic Musc from a Metabolic Product of Corn Smut in Artificial Culture. *Perfumery and Essential Oil Record* **44**, 136-139.
- LIN, C.-C., SHIMAZAKI, M., HECK, M.-P., AOKI, S., WANG, R., KIMURA, T., RIZTÈN, H., TAKAYAMA, S., WU, S.-H., WEITZ-SCHMIDT, G. and WONG, C.-H., 1996. Synthesis of Sialyl Lewis X Mimetics and Related Structures Using the Glycosyl Phosphite Methodology and Evaluation of E-Selectin Inhibition. *J Am Chem Soc* **118**, 6826-6840.

- LJUNGER, G., ADLERCREUTZ, P., MATTIASSON, B., 1994. Lipase catalyzed acylation of glucose. *Biotechnol Lett* **16**, 1167-1172.
- LJUNGER, G., ADLERCREUTZ, P., MATTIASSON, B., 1994. Enzymatic synthesis of octyl- β -glucoside in octanol at controlled water activity. *Enzyme Microb Technol* **16**, 751-755
- LOCKSTOFF, O., 1991. Glycolipide als Immunmodulatoren – Synthese und Eigenschaften. *Angew Chem* **103**, 1639-1649.
- LOKOTSCH, W., 1994. Biokatalytische Synthese und physiko-chemische Charakterisierung von ungewöhnlichen Wachsesteren. Dissertation, TU Braunschweig
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- MANZKE, C., 1998. Prozessabhängige Aufarbeitung und HPLC-gestützte Analyse von Sophoroselipiden aus *Candida bombicola*. Dissertation, TU Braunschweig.
- MATSUFUJI, M., TAGUCHI, K., INAGAKI, M., HIGUCHI, R., OHTA, S., YOSHIMOTO, A., 2000. Glycoglycerolipids Preventing tert-Butylhydroperoxide-Induced Cell Death from *Microbacterium spec.* and *Corynebacterium aquaticum* strains, *J Biosci Bioeng*, **89**, 170-175.
- MATTHIES, W., JACKWERTH, B. und KRÄCHTER, H.-U., 1996. Dermatological Properties of Alkyl Polyglycosides. In: Alkyl Polyglycosides, hrsg. Hill, K., von Rybinsky, W. und Stoll, G.. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 99-130.
- MCCLURE, C.D. and SCHILLER, N.L., 1992. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. *J Leukocyte Biol* **51**, 97-102.
- MERCK, 1995. Biochemika-Katalog (MECK, Darmstadt).
- MILLER, C., AUSTIN, H., POSORKE, C. and GONZALES, J., 1988. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters, *JAOCS* **65**, 6, 927-931.
- MULTZSCH, R., 1995 Untersuchungen zur Enzymatischen Synthese und zum Grenzflächenverhalten ungewöhnlicher Decansäureoctylester. Dissertation, TU Braunschweig
- MURAKAMI, A., NAKAMARA, Y., KOSHIMIZU, K., OHIGASHI, H., 1995. Glycoglycerolipids from *Citrus hystrix*, a Traditional Herb in Thailand, Potently Inhibit the Tumor-Promoting Activity of 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate, *J Agric Food Chem* **43**, 2779-2783.
- MUTUA, L. N., AKOH, C. C., 1993. Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida sp.* lipase. *J Am Oil Chem Soc* **70**, 43-46.
- MYERS, D., 1988. Surfactant science and technology, VCH Weinheim

- NÄVEKE, R. und TEPPNER, K. P., 1986. Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden (G. Fischer Verlag, Stuttgart).
- NEU, T.R., 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol Rev* **60**, 151-166.
- NISHIKAWA, Y., YOSHIMOTO, K., OKADA, M., IKEKAWA, T., ABIKO, N. and FUKUOKA, F., 1977. Chemical and Biochemical Studies on Carbohydrate Esters. V. Anti Ehrlich Ascites Tumor Effect and Chromatographic Behavior of Fatty Acyl Monoesters of Sucrose and Trehalose. *Chem Pharm Bull* **25**, 1717-1724.
- Normenausschuß Medizin, 1989. Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nach der Boullion-Dilutionsmethode (Makrodilution). In: DIN 58940 (Hrsg.: Normenausschuß Medizin im Institut für Normung e.V.)
- NOROUZIAN, D., HOSSEINZADEH, A., NOURI, D. AND MOAZAMI, N., 2000. Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. *World J Microbiol Biotechnol* **16**, 471-473.
- NÖRTEMANN, B. und HEMPEL, D. C., 1994. Abbau von Komplexbildnern. *Biotechnol Bioeng* **10**, 49-53.
- OCHSNER, U.A., REISER, J., FIECHTER, A. and WITHOLT, B., 1995. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3503-3506.
- OGUNTMEIN, G. B., ERDMANN, H. and SCHMID, R. D., 1993. Lipase catalyzed synthesis of sugar ester in organic solvent. *Biotechnol. Lett.* **15**, 175-180.
- PARK, H.-O. and LEE, D.-S., 1992. Sugar solubilisation agent for enzymatic condensation of glucose in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* **14**, 111-116.
- PASSERI, A., LANG, S., WAGNER, F., WRAY, V., 1991. Marine biosurfactants, II. Production and characterisation of an anionic trehalose tetraester from the marine bacterium *Arthrobacter spec.* EK1. *Z Naturforsch* **46** c, 204-209.
- PATEL, R.M. and DESAI, A.J., 1997. Surface-active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* GS3. *J Basic Microbiol* **37**, 281-286.
- PLOU, F.J., CRUCES, M.A., PASTOR, E., FERRER, M., BERNABE, M. and BALLESTOROS, A., 1999. Acylation of sucrose with vinyl esters using immobilized hydrolases: demonstration that chemical catalysis may interfere with enzymatic catalysis. *Biotechnol Lett* **21**, 635-639
- PLOU, F. J., CRUCES, M. A., FERRER, M., FUENTES, G., PASTOR, E., BERNABÉ, M., CHRISTENSEN, M., COMELLES, F., PARRA, J. L., BALLESTEROS A., 2002. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids : choosing the appropriate enzyme, support and solvent. *J Biotechnol* **96**, 55-66.
- POLAT, T., BAZIN, H.G. and LINHARDT, R.J., 1997. Enzyme catalyzed regioselective synthesis of sucrose fatty acid surfactants. *J Carbohydr Chem* **16**, 1319-1325

- POREMB, K., GUNKEL, W., LANG, S. UND WAGNER, F., 1989. Mikrobieller Ölabbau im Meer. *Biologie in unserer Zeit* **19**, 145-148.
- POWALLA, M., LANG, S. and WRAY, V., 1989. Penta- and Disaccharide Lipid Formation by *Nocardia corynebacteriodis* Grown on n-Alkanes. *Appl Microbiol Biotechnol* **31**, 473-479.
- POWALLA, M., 1990. Mikrobielle Bildung und Charakterisierung grenzflächenaktiver Penta- und Disaccharidlipide aus *Nocardia corynebacteroides*. Dissertation TU Braunschweig.
- RAEBEL, M., SCHLIERF, H., 1980. Ermittlungen zur Erfassung der Biomasse von Belebtschlämmen durch quantitative Analyse der Desoxyribonucleinsäure (DNS). *Jahrbuch vom Wasser* **54**. Weinheim: Verlag Chemie.
- RAMANA, K.V. and KARANTH, N.G., 1989. Factors affecting biosurfactants production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *J Chem Technol Biotechnol* **45**, 249-257.
- RAMM, W., 2001. Bildung und Charakterisierung biologisch und physiko-chemisch aktiver Metabolite aus den marinen schwamm-assoziierten Bakterien *Psychroflexus spec. nov.* und *Bacillus subtilis*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- RAMSAY, B., MCCCHARHY, J., GUERRA-SANTOS, L., KAPPELI, O. and FIECHTER, A., 1988. Biosurfactant Production and Diauxic Growth of *Rhodococcus aurantiacus* when Using n-Alkanes as the Carbon Source. *Can J Microbiol* **24**, 1209-1212.
- RAPP, P., BOCK, H., WRAY, V., WAGNER, F., 1979. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *J Gen Microbiol* **115**, 491-503.
- RAU, U., MANZKE, C., WAGNER, F., 1996. Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Biotechnol Lett* **18**, 149-154.
- RAU, U., HAMMEN, S., HECKMANN, R., WRAY, V., LANG, S., 2001. Sophorolipids: a source for novel compounds. *Ind Crops Prod* **13**, 85-92.
- READ, R.C., ROBERTS, P., MUNRO, N., RUTMAN, A., HASTIE, A., SHYROCK, T., HALL, R., McDONALD-GIBSON, W., LUND, V. and TAYLOR, G., 1992. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J Appl Physiol* **72**, 2271-2277.
- REEDY, P.G., SINGH, H.D., ROY, P.K. and BARUAH, J.N., 1982. Predominant Role of Hydrocarbon Solubilization in the Microbial Uptake of Hydrocarbons. *Biotechnol Bioeng* **24**, 1241-1269.
- RICH, J.O., BEDELL, B.A. and DORDICK, J.S., 1995. Controlling enzyme-catalyzed regioselectivity in sugar ester synthesis. *Biotechnol Bioeng* **54**, 426-434
- RICHTLER, H. J. and KNAUT, J., 1991. Surfactants in the Nineties. *Seifen-Öle-Fette-Wachse* **115**(15), 545-553.

- RISTAU, E., 1983. Mikrobielle Produktion von grenzflächenaktiven Trehaloselipiden aus n-Alkanen; Strukturaufklärung eines anionischen Trehalose-tetraesters. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.
- RISTAU, E. and WAGNER, F., 1983. Formation of Novel Anionic- Trehalose-tetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under Growth Limiting Conditions. Biotechnol Lett **5**: 95-100.
- RYBINSKI, von, W. und HILL, K., 1998. Alkylpolyglycoside – Eigenschaften und Anwendungen einer neuen Tensidklasse. Angew Chem **110**, 1394-1412.
- SAADAT, S., and BALLOU, C., 1983. Pyruvylated glycolipids from *Mycobacterium smegmatis*. Structures of two oligosaccharide components. J Biol Chem **258**, 1813-1818.
- SALTON, M. R. J., 1968. Lytic Agents, Cell Permeability and Monolayer Penetrability. J. Gen Phys **52**, 227-254.
- SCHÄCHTELE, C., 2000. Bericht über Testergebnisse, KTB Tumorforschungs GmbH, Institut für Molekulare Medizin und Naturforschung, Freiburg.
- SCHECKERMANN, C., SCHLOTTERBECK, A., SCHMIDT, M., WRAY, W., LANG, S., 1995. Enzymatic monoacylation of fructose by two procedures. Enzyme and Microbial Technology **14**, 157-162.
- SCHLEGEL, H. G., 1992. Allgemeine Mikrobiologie, 7. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- SCHLOTTERBECK, A., LANG, S., WRAY, V. AND WAGNER, F., 1993. Lipase-catalyzed monoacylation of fructose. Biotechnol. Lett. **15**, 61-64.
- SCHMIDT, U., 1999. Lipase-Katalysierte Synthese strukturierter Triglyceride: Verfahrensoptimierung und Erzeugung selektiver Lipasemutanten durch gerichtete Evolution. Dissertation Universität Stuttgart.
- SCHULZ, D., PASSERI, A., SCHMIDT, M., LANG, S., WAGNER, F., WRAY, V. und GUNKEL, W., 1991. Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganisms from the North Sea. Naturforsch **46 c**, 197-203.
- SCHULZ, D., 1992. Strukturaufklärung und Charakterisierung von Biotensiden des marinen Bakteriums *Arthrobacter* sp. S11 und der marinen Hefe NS/JR1. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- SHENNAN, J.L. und LEVI, J.D., 1987. In situ microbial enhanced oil recovery. In: Kosaric, N., Cairns, W.L., Gray, N.C.C. (eds) Biosurfactants and Biotechnology. In: Surfactants Science Series, Vol **25**, pp. 163-181, Dekker, New York, Basel.
- SHILVOCK, J. P., NASH, R. J., WATSON, A. L., BUTTERS, T. D., RAYMOND, A. D., WINKLER, D. A. and FLEET, G.W.J., 1999. Piperidine analogues of D-galactose as potent inhibitors of β -galactosidase: Synthesis by stannane-mediated hydroxymethylation of 5-azido-1,4-lactones. Structural relationships between D-galactosidase and L-rhamnosidase inhibitors. J. Chem. Soc. **1**. 2747-2754

- SIEMANN, M. und WAGNER, F., 1993. Prospects and limits for the production of biosurfactants using immobilized biocatalysts. In: Kosaric, N. (ed) Biosurfactants. In: Surfactant Science Series Vol **48**, pp. 99-133. Dekker, New York, Basel, Hong Kong.
- SPÖCKNER, S., 1994. Funktionalisierung eines mikrobiellen Sophoroselipides. Diplomarbeit TU Braunschweig.
- SPÖCKNER, S. und LANG, S., 1998. Glycolipide von *Ustilago maydis* auf der Basis heimischer Pflanzenöle. In: Biokonversion nachwachsender Rohstoffe, Tagungsband, in: Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe, Band 10, pp. 225-230, Hrsg. fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (Gülzow), LV-Druck, Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster.
- SPÖCKNER, S., WRAY, V., NIMTZ, M. und LANG, S., 1999. Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. Appl Microbiol Biotechnol **51**, 33-39.
- STAHL, E., 1967. Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag, Berlin
- STANGHELLINI, M.E. and MILLER, R.M., 1997. Biosurfactants – Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. Plant Disease **81**, 4-12.
- STANISLAVSKY, E.S. and LAM, J.S., 1997. *Pseudomonas aeruginosa* antigens as potential vaccines. FEMS Microbiol Rev **21**, 243-277.
- STEBER, J. , GUHL, W., STEHLER, N. und SCHRODER, F. R., 1996. Ecological evaluation of Alkyl Polyglycosides. In Alkyl Polyglycosides, hrsg. von Hill, K., Rybinski, W. und Stoll, G., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, pp. 177-190.
- STEFFEN, B., ZIEMANN, A., LANG, S. and WAGNER, F., 1992. Enzymatic monoacylation of trihydroxy compounds. Biotechnol. Lett. **14**, 9, 773-778.
- STEFFEN, B., 1994. Lipasekatalysierte Synthese von Wachsester und Monoglyceriden aus ungewöhnlichen Fettsäurekomponenten sowie Bestimmung ihrer Grenzflächeneigenschaften. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- STOLYHWO, A., COLIN, H. and GUIOCHON, G., 1985. Analysis of Triglycerides in Oils and Fats by Liquid Chromatography with the Laser Light Scattering Detector. Anal Chem **57**, 1342-1454
- SYLDATK, C., 1984. Mikrobielle Bildung und Charakterisierung grenzflächenaktiver Rhamnolipide aus *Pseudomonas spec.* DSM 2874, Dissertation Technische Universität Braunschweig.
- SYLDATK, C., MATULOVIC, U., WAGNER, F., 1984. Biotenside – Neue Verfahren zur mikrobiellen Herstellung grenzflächenaktiver, anionischer Glycolipide. Biotech-Forum **1**, 58-66.

- SYDATK, C., LANG, S., WAGNER, F., WRAY, V., WITTE, L., 1985. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. *Z Naturforsch* **40** c, 61-97.
- SYLDATK, C., WAGNER, F., 1987. Production of Biosurfactants. In: *Biosurfactants and Biotechnology*, hrsg. Kosaric, N., Cairns, W.L., und Gray, N.C.C., pp. 89-120, Dekker, New York.
- TESMANN, H., KAHRE, J., HENSEN, H., BARRY, B. und SALKA, A., 1996. Alkyl Polyglycosides in Personal Care Products. In *Alkyl Polyglycosides*, hrsg. von Hill, K., von Rybinsky, W. und Stoll, G.. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel Cambridge Tokyo, pp. 71-98.
- THERISOD, M., KLIBANOV, AM., 1986. Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. *J Am Chem Soc* **108**, 5638-5640.
- TOMIYASU, I., YOSHINAGA, J., KURANO, F., KATO, Y., KANEDA, K., IMAIZUMI, S. and YANO, I., 1986. Occurrence of a Novel Glycolipid, trehalose 2,3,6'-Trimycolate in a Psychrophilic, Acid-Fast Bacterium, *Rhodococcus aurantiacus* (*Gorconia aurantiacea*) *FEBS Letters* **203**, 239-242.
- TRAVING, M., BART, H.-J., NEU, A., 1999. Organic acid Recovery from Fermentation broths using reactive sorption. kumm. Diplomarbeit. Universität Kaiserslautern, Lehrstuhl für Thermische Verfahrenstechnik.
- UCHIDA, Y., MISAWA, S., NAKAHARA, T. and TABUCHI, T., 1989. Factors Affecting the Production of Succinoyl Trehalose Lipids by *Rhodococcus erythropolis* SD-74 Grown on n-Alkanes. *Agric Biol Chem* **53**, 765-769.
- UCHIDA, Y., TSUCIYA, R., CHINO, M., HIRANO, J. and TABUCHI, T., 1989. Extracellular Accumulation of Mono- and Di- Succinoyl-Trehaloselipids by a Strain of *Rhodococcus erythropolis* Grown on n-Alkanes. *Agric Biol Chem* **53**, 757-763.
- UPADEK, H. und KINGS, P., 1991. Waschmitteltrends unter den Gesichtspunkten Leistung und Umweltverträglichkeit. *Seifen, Öle, Fette, Wachse Journal* **15**, 554-558.
- VARA, M., (1992). Agents that Increase the Permeability of the Outer Membrane. *Microbiol Rev* **56**, 395-411.
- VOLLBRECHT, E., LANG, S. and RAU, U., 1999. Microbial Conversion of Vegetable Oils into Surface-active Oligosaccharide Lipids. *Lipid* **101**, 389-394
- VOLLBRECHT, E., HECKMANN, R., WRAY, V., NIMTZ, M. and Lang, S., 1998. Production and Structure Elucidation of Di- and Oligosaccharide Lipids (Biosurfactants) from *Tsukamurella* sp. nov.. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 530-537
- VOLLBRECHT, E., 1999. Mikrobielle Produktion von Oligosaccharidlipiden auf der Basis pflanzlicher Öle durch *Tsukamurella* spec. nov.. Dissertation, TU Braunschweig
- VULFSON, E.N., 1993. Enzymatic synthesis of food ingredients in low-water media. *Food Sci Technol* **4**, 209-215.

- WAGNER, F., 1987. Strategies for Biosurfactant Production. *Fat Sci Technol* **89**, 586-591.
- WAKAMATSU, Y., ZHAO, X., JIN, Ch., DAY, N., SHIBAHARA, M., NOMURA, N., NAKAHARA, T., MURATA, T. and YOKOYAMA, K., 2001. Mannosylerythritol lipid induces characteristics of neuronal differentiation in PC 12 cells through an ERK-related signal cascade. *Eur J Biochem* **268**, 374-383.
- WARWEL, S., 1998. Technische Produkte durch Umwandlung von Stoffen der Natur mit Methoden der Natur. Biokonversion nachwachsender Rohstoffe. Schriftenreihe: "Nachwachsende Rohstoffe", **10**. Landwirtschaftsverlag, Münster, pp. 13-21.
- WICKE, C., 1999. Produktion und Charakterisierung von biologisch und physikochemisch wirksamen Metaboliten aus dem marinen schwammassoziierten Bakterium *Microbacterium spec. nov.* DSM 12583. Dissertation Technische Universität Braunschweig.
- WILSON, K., GOULDING, K. H., 1991. Methoden der Biochemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- WINKLER, F.K., D'ARCY, A., HUNZIKER, W., 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**, 771-774.
- WINKLER, U.K. and STRUCKMANN, M., 1979. Glycogen, Hyaluronate and some other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **138**, 663-670.
- WINTER, C. H., HOVING, E. B. and MUSKIET, F. A. J., 1993. Fatty Acid Composition of Human Milk Tryglyceride Species. *J Chromatogr* **616**, 9-24.
- WIRTH, W., 1975. Nichtionische Tenside: Bedeutung, Herstellungsverfahren, Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten. *Tenside Detergents* **12**, 245-255.
- WOLFROM, M. L. AND SOLMS, J., 1956. Phenylboronates of pentoses and 6-Deoxyhexoses. *J Org Chem* **21**, 815-816.
- WOUDENBERG-VAN OOSTEROM, M., RANTWIJK, Fv., SHELDON, RA., 1996. Regioselective Acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnol Bioeng* **49**, 328-33
- ZAKS, A., KLIBANOV, A., M., 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science* **224**, 1249-1251.
- ZAKS, A., KLIBANOV, A., M., 1988. The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem* **263**, 8017-8021.
- ZAKS, A., RUSSEL, A., J., 1988. Enzymes in organic solvents: Properties and application. *J. Biotechnol* **8**, 259-270
- ZOBELL, C. E., 1946. Action of microorganism on hydrocarbons. *Bacteriol Rev* **10**, 1-49.